



TIAGO VITOR ERMIDA CRAVO      Estudo da bioatividade de óleos essenciais de várias plantas e de compostos isolados  
Study of the bioactivity of essential oils from several plants and isolated compounds



TIAGO VITOR ERMIDA CRAVO      Estudo da bioatividade de óleos essenciais de várias plantas e de compostos isolados

Study of the bioactivity of essential oils from several plants and isolated compounds

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Mendonça Rocha, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade Beira Interior, e da Doutora Marta Cristina Oliveira Martins Tacão, Investigadora do Departamento de Biologia e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro.

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios electrónicos, quer de trabalhos académicos.

Dedico este trabalho à pessoa que mais amo na minha vida, a minha irmã, Sara Cristina Ermida Cravo. Ao meu irmão Guilherme Cravo por todos os ensinamentos e força que me deu na curta caminhada que tem sido a minha vida.

Dedico também aos meus pais que sempre me amaram e estiveram de forma incansável do meu lado.

Por último, à memória dos meus queridos avós.

o júri

Presidente:

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves  
Professor Auxiliar com agregação, Universidade de Aveiro

Vogal - Arguente principal:

Prof. Doutor David Díez Martín,  
Professor Catedrático, Universidad de Salamanca

Vogal - Orientador:

Prof. Doutor Pedro Miguel de Mendonça Rocha  
Professor Auxiliar, Universidade da Beira Interior

## agradecimentos

Ao longo deste ano deparei-me com diversas dificuldades tanto a nível pessoal como académico. Este trabalho foi realizado devido ao apoio incessante da minha família, dos meus amigos, colegas de trabalho e dos meus orientadores. Foi um ano cheio de aprendizagem que, com toda a certeza, me preparou para um futuro laborioso e, por outro lado, me tornou um ser humano melhor.

Gostaria de agradecer, ainda, à Universidade da Beira Interior que me recebeu como aluno da casa e também à Universidade de Aveiro que sempre me acolheu como um filho e me deu todos os recursos para que o término desta etapa essencial na minha vida fosse possível.

Não esquecerei, igualmente, o laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares, LDA. Covilhã por me ter dado a oportunidade de realizar parte do meu projeto experimental e todo o apoio das pessoas que dele fazendo parte o tornam uma instituição de excelência.

Gostava também de deixar um grande abraço ao meu amigo e colega Rui pelo empenho que teve para comigo e estou-lhe ainda grato por todo o conhecimento que por ele me foi transmitido. Não posso de deixar de referir ainda o meu amigo de todas as horas, Diogo Ribeiro, face à grande paciência e apoio que por ele me foram facultados neste meu itinerário.

Segue ainda um abraço de apreço para o Prof. Doutor Pedro Miguel Mendonça Rocha que foi, para mim, um alicerce como orientador e mentor deste meu percurso. Cabe aqui, do mesmo modo, um agradecimento especial à minha orientadora da casa, Prof. Marta Tação por toda a disponibilidade demonstrada por si.

Cumprir que deixe um agradecimento final a todas as pessoas que neste percurso me deram a mão e me ajudaram a chegar a bom porto.

No fim de tudo sou levado a concluir que a vida é um mar promissor cheio de sonhos, os quais, quando terminam permitem que outros comecem.

## palavras-chave

Óleos essenciais, compostos isolados, antimicrobiano, testes de screening, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

## resumo

No presente trabalho ir-se-á abordar a potencialidade das plantas como agentes terapêuticos. São utilizadas há milhares de anos, porém não se sabia o modo como atuavam. Devido a uma enorme resistência aos antibióticos comuns, houve a necessidade de se começar a estudar produtos naturais, neste caso os óleos essenciais das plantas. O objetivo foi evidenciar a potencialidade de certas plantas em comparação com determinados agentes terapêuticos sintéticos que têm vindo a ser alvo de resistência por parte dos microrganismos que outrora não eram resistentes. As bactérias em estudo foram a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). Os testes de screening utilizados neste projeto foram os métodos de difusão por cavidades (poços) em placas de agar, do efeito do vapor em placa de agar, para que, assim, fosse possível determinar os halos de inibição provocados pelos compostos em estudo. Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) realizou-se o método de diluição em caldo, neste caso, a macrodiluição. Na dissertação foram utilizados óleos essenciais das plantas *Cistus ladanifer*, *Lippia multiflora*, *Eucalyptus globulus* e ainda da *Mentha spicata*. Os compostos isolados das mesmas foram o Cineol,  $\beta$ -pineno e a S (+) carvona. Em estudos anteriores, demonstrou-se que todos os óleos utilizados e também os compostos isolados apresentaram alguma atividade antimicrobiana. De um modo geral, os resultados obtidos levam a crer que os óleos extraídos de plantas, principalmente o óleo de *Cistus ladanifer*, bem como os compostos isolados em si presentes podem ser alternativas naturais ao uso de compostos sintéticos no tratamento de diversas doenças provocadas pelas bactérias testadas.

## keywords

Essential oils, isolated compounds, antimicrobial, screening tests, Gram positive and Gram negative bacteria;

## summary

In the present work, the potentiality of plants as therapeutic agents will be addressed. They have been used for thousands of years, but it was not known how they acted. Due to an enormous resistance to the common antibiotics, it was necessary to start studying natural products, in this case the essential oils of the plants. The objective was to highlight the potentiality of certain plants compared to certain synthetic therapeutic agents that have been subject to resistance by the microorganisms that were once not resistant. The bacteria under study were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). The screening tests used in this project were the agar plate diffusion methods (wells), from the effect of vapor on agar plate, so that it was possible to determine the inhibition halos caused by the compounds under study. For the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MCB) the broth dilution method, in this case, the macrodilution, was carried out. In the dissertation, essential oils of the plants *Cistus ladanifer*, *Lippia multiflora*, *Eucalyptus globulus* and *Mentha spicata* were used. The compounds isolated from them were Cineol,  $\beta$ -pinene and S-(+)-carvone. In previous studies, it was shown that all the oils used and also the isolated compounds showed some antimicrobial activity. In general, the results obtained lead us to believe that oils extracted from plants, especially *Cistus ladanifer* oil, as well as the isolated compounds present themselves may be natural alternatives to the use of synthetic compounds in the treatment of various diseases caused by bacteria tested.



# Índice

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de abreviaturas.....	vi
1. Introdução .....	10
1.1. Óleos essenciais .....	10
1.1.1. Composição principal dos óleos essenciais.....	10
1.2. <i>Cistus ladanifer</i> , <i>Lippia multiflora</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Mentha spicata</i> .....	11
1.2.1. Descrição <i>Cistus Ladanifer</i> .....	11
1.2.2. Descrição <i>Lippia multiflora</i> .....	12
1.2.3. Descrição <i>Eucalyptus globulus</i> .....	13
1.2.4. Descrição <i>Mentha spicata</i> .....	14
1.3. Microbiologia.....	15
1.4. Caracterização da célula bacteriana .....	16
1.5. Bacteriologia.....	17
1.5.1. Distinção entre bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas .....	19
1.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.5.3. <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.5.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
1.6. Atividade dos agentes antimicrobianos .....	26
1.6.1. Penicilina G .....	27
1.6.2. Gentamicina .....	28
1.7. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
1.8. Sinergismo e antagonismo entre os compostos dos óleos essenciais .....	30

1.9.	Métodos para analisar a atividade antimicrobiana.....	31
1.9.1.	Métodos de difusão em placa de agar .....	31
1.9.2.	Perfuração de cavidades cilíndricas .....	32
1.9.3.	Efeito vapor do óleo essencial.....	32
1.9.4.	Método de diluição em caldo .....	33
1.9.5.	Macrodiluição.....	34
1.9.6.	Teste da rezasurina .....	35
1.10.	Fatores que interferem com os métodos de atividade antibacteriana .....	36
1.10.1.	Meio de cultura.....	36
1.10.2.	Disponibilidade de oxigénio .....	37
1.10.3.	Padronização do inóculo.....	37
1.10.4.	pH .....	38
1.10.5.	Condições de incubação .....	38
2.	Objetivo .....	39
3.	Materiais e métodos .....	40
3.1.	Óleos essenciais presentes nas plantas teste .....	40
3.2.	Meios de Cultura.....	40
3.3.	Microrganismos teste .....	42
3.4.	Densidade do inóculo.....	43
3.5.	Métodos de difusão em placa com agar .....	44
3.5.1.	Difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas .....	45
3.5.2.	Difusão em agar por efeito de vapor .....	45
3.5.3.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida por macrodiluição .....	46
4.	Resultados e discussão .....	47
4.1.	Constituição dos óleos essenciais das plantas em estudo .....	47

4.1.1. <i>Cistus Ladanifer</i> .....	47
4.1.2. <i>Líppia multiflora</i> .....	49
4.1.3. <i>Eucalyptus globulus</i> .....	51
4.1.4. <i>Mentha spicata</i> .....	52
4.2. Atividade antimicrobiana das plantas em estudo .....	55
4.2.1. Halos de inibição pela técnica do poço .....	59
4.2.2. Halos de inibição pela técnica do efeito de vapor .....	68
4.2.3. CMI e CMB – Método de macrodiluição.....	73
4.3. Tratamento estatístico .....	81
5. Conclusões.....	85
6. Perspetivas futuras .....	88
7. Bibliografia.....	89

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Imagem de <i>Cistus ladanifer</i> .....	11
<b>Figura 2</b> – Imagem de <i>Lippia multiflora</i> .....	12
<b>Figura 3</b> – Imagem de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	13
<b>Figura 4</b> – Imagem de <i>Mentha spicata</i> .....	14
<b>Figura 5</b> – Determinadas morfologias inerentes a bactérias.....	18
<b>Figura 6</b> – Representação da constituição e estruturas das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
<b>Figura 7</b> – <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
<b>Figura 8</b> – <i>Staphylococcus aureus</i> cultivado em placa.....	21
<b>Figura 9</b> – <i>Escherichia coli</i> .....	23
<b>Figura 10</b> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
<b>Figura 11</b> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivado em placa.....	25
<b>Figura 12</b> – Penicilina G.....	27
<b>Figura 13</b> – Gentamicina.....	28
<b>Figura 14</b> – Exemplos de agar com cavidades, após ensaios realizados.....	32
<b>Figura 15</b> – Exemplos de ensaios realizados pela técnica de vapor e o halo de inibição obtido.....	33
<b>Figura 16</b> – Exemplos de uma macrodiluição realizada.....	34
<b>Figura 17</b> – Exemplos de uma macrodiluição realizada após a adição de resazurina.....	35
<b>Figura 18</b> – Exemplo de um instrumento destinado para a realização de GC-MS.....	40
<b>Figura 19</b> – Meio de cultura Mueller-Hinton.....	41
<b>Figura 20</b> – Exemplo de agar desidratado da Oxoid.....	41
<b>Figura 21</b> – Microrganismos testes utilizados na dissertação.....	42

<b>Figura 22</b> – Densitómetro utilizado na dissertação com a turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5.....	44
<b>Figura 23</b> – Exemplo da técnica de diluição em caldo realizada.....	46
<b>Figura 24</b> – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de <i>Cistus ladanifer</i> .....	47
<b>Figura 25</b> – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de <i>Lippia multiflora</i> .....	49
<b>Figura 26</b> – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	51
<b>Figura 27</b> – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de <i>Mentha spicata</i> .....	52
<b>Figura 28</b> – Técnica de difusão por perfuração em poços na esquerda e, na direita, técnica de efeito vapor.....	55
<b>Figura 29</b> – Técnica de difusão por perfuração em poços com os respetivos controlos....	59

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Principais compostos presentes no óleo de <i>Cistus Ladanifer</i> .....	48
<b>Tabela 2</b> – Principais compostos presentes no óleo de <i>Líppia multiflora</i> .....	50
<b>Tabela 3</b> – Principais compostos presentes no óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	52
<b>Tabela 4</b> – Principais compostos presentes no óleo de <i>Mentha spicata</i> .....	53
<b>Tabela 5</b> – Classificação da susceptibilidade dos microrganismos por comparação dos halos de inibição dos óleos das plantas e dos compostos isolados face aos halos resultantes dos controlos positivos .....	56
<b>Tabela 6</b> – Diâmetro dos halos inibitórios dos controlos positivos e negativos pela técnica de difusão por perfuração em poços .....	60
<b>Tabela 7</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Cistus ladanifer</i> pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	61
<b>Tabela 8</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Líppia multiflora</i> pela técnica de difusão por perfuração em poços .....	62
<b>Tabela 9</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	63
<b>Tabela 10</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Mentha spicata</i> pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	64
<b>Tabela 11</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado $\beta$ -pineno pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	65
<b>Tabela 12</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado Cineol pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	66
<b>Tabela 13</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado S-(+)-carvona pela técnica de difusão por perfuração em poços.....	67
<b>Tabela 14</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Cistus ladanifer</i> pela técnica do efeito de vapor.....	68

<b>Tabela 15</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Líppia multiflora</i> pela técnica do efeito de vapor.....	69
<b>Tabela 16</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> pela técnica do efeito de vapor.....	69
<b>Tabela 17</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de <i>Mentha spicata</i> pela técnica do efeito de vapor.....	70
<b>Tabela 18</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado $\beta$ -pineno pela técnica do efeito de vapor.....	71
<b>Tabela 19</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado Cineol pela técnica do efeito de vapor.....	71
<b>Tabela 20</b> – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado S-(+)-carvona pela técnica do efeito de vapor.....	72
<b>Tabela 21</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Cistus ladanifer</i> – 1º ensaio .....	74
<b>Tabela 22</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Cistus ladanifer</i> – 2º ensaio .....	74
<b>Tabela 23</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> – 1º ensaio.....	75
<b>Tabela 24</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> – 2º ensaio.....	75
<b>Tabela 25</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Líppia multiflora</i> – 1º ensaio.....	76
<b>Tabela 26</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Líppia multiflora</i> – 2º ensaio.....	76
<b>Tabela 27</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Mentha spicata</i> – 1º ensaio.....	77
<b>Tabela 28</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de <i>Mentha spicata</i> – 2º ensaio.....	77

<b>Tabela 29</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência $\beta$ -pineno – 1 <sup>o</sup> ensaio.....	78
<b>Tabela 30</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência $\beta$ -pineno – 2 <sup>o</sup> ensaio.....	78
<b>Tabela 31</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência Cineol – 1 <sup>o</sup> ensaio.....	79
<b>Tabela 32</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência Cineol – 2 <sup>o</sup> ensaio.....	79
<b>Tabela 33</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência S-(+)-carvona – 1 <sup>o</sup> ensaio.....	80
<b>Tabela 34</b> – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência S-(+)-carvona – 2 <sup>o</sup> ensaio.....	80
<b>Tabela 35</b> – Resultados obtidos dos halos de inibição dos óleos das plantas no ensaio de difusão por perfuração de cavidades em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.....	81
<b>Tabela 36</b> – Resultados obtidos dos halos de inibição dos compostos isolados no ensaio de difusão por perfuração de cavidades em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.....	82
<b>Tabela 37</b> – Resultados obtidos dos halos de inibição dos óleos das plantas no ensaio do efeito de vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.....	83
<b>Tabela 38</b> – Resultados obtidos dos halos de inibição dos compostos isolados no ensaio do efeito de vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.....	84



# Lista de abreviaturas

**ATCC** - American Type Culture Collection

**GC-MS** - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

**CMB** - Concentração Mínima bactericida

**CMI** - Concentração Mínima inibitória

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**Gram +** - Bactérias Gram-positivas

**Gram -** - Bactéria Gram-negativas

**MH** - Mueller Hinton

**UFC** - Unidades formadoras de colónias

**McF** - Unidades McFarland

# **1. Introdução**

## **1.1. Óleos essenciais**

Nas últimas décadas foi necessário recorrer a pesquisas de compostos bioativos produzidos por organismos vivos como as plantas, fungos e bactérias, dado que começou a ser comprovado que estes podem possuir potencialidades tanto farmacológicas como biotecnológicas. A necessidade da pesquisa incessante destes novos compostos deveu-se a um aumento exponencial de microrganismos resistentes a antibióticos. Desta forma, desencadeou-se, assim, um acréscimo de infecções sem opções de tratamento e doenças prolongadas, culminando num aumento da taxa de mortalidade (Vieira *et al.*, 2017) (WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

No caso concreto das plantas, estas são utilizadas para fins medicinais desde a antiguidade mesmo desconhecendo-se o mecanismo de ação. Contudo, nos dias de hoje, sabe-se que contêm extratos naturais com atividade antimicrobiana, nomeadamente os metabolitos secundários (Hayek *et al.*, 2013) (Stankovic *et al.*, 2016). Estes compostos, provenientes das plantas, que têm sido mais estudados são, principalmente, os óleos essenciais a fim de serem usados como aditivos alimentares sintéticos, relaxantes, antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, sedativos, entre outros (Hyltdgaard et al., 2012) (Wang et al., 2011).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diferentes partes da planta, desde as raízes, caules ou folhas. Estes valiosos componentes das plantas são complexas misturas químicas, compreendendo, geralmente, entre 30 a 70 compostos (Vieira *et al.*, 2017).

### **1.1.1. Composição principal dos óleos essenciais**

Como anteriormente se referiu, os óleos essenciais das plantas apresentam inúmeras qualidades que podem ser benéficas para o ser humano. Como se mencionou no ponto anterior, hoje em dia sabe-se que, os mesmos, são misturas constituídos por cerca de 30 a 70 compostos químicos, em média. Os principais compostos presentes nos óleos das

plantas são os terpenóides, os quais são compostos que têm como origem um esqueleto de cinco carbonos ( $C_5$ ) sendo esta unidade designada de isoterpeno. Mas no caso dos óleos essenciais tem-se verificado que a maior abundância se deve aos monoterpenos ( $C_{10}$ ) e aos sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Contudo também são encontrados com alguma frequência diterpenos ( $C_{20}$ ). (Vieira *et al.*, 2017). Embora os compostos químicos anteriormente mencionados se encontrem em maior abundância, também encontramos compostos como álcoois, ácidos, aldeídos, hidrocarbonetos, entre outros (Zouari *et al.*, 2012).

No entanto, os elementos mais conhecidos como sendo os responsáveis por conferir características farmacológicas e aromáticas a uma planta são os terpenos. E são esses os que revelam o maior foco de interesse no estudo das atividades antimicrobianas (Lakusic *et al.*, 2012).

## **1.2. *Cistus ladanifer*, *Lippia mulitflora*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata***

### **1.2.1. Descrição *Cistus Ladanifer***



**Figura 1** – Imagem de *Cistus ladanifer* [Consultado e adaptado em <https://www.google.com/search?q=cistus+ladanifer>, a 4 de maio de 2019].

As plantas de *Cistus ladanifer* são utilizadas desde tempos remotos com fins medicinais. Por exemplo, em Espanha, eram usadas como chá ou pomada para a prevenção de diversas doenças e mesmo distúrbios microbianos. Assim, a planta *Cistus ladanifer* revela possuir na sua composição agentes anti-infecciosos naturais (Loizzo *et al.*, 2013).

Nos dias de hoje, continuam a ser realizados estudos científicos com esta planta evidenciando a capacidade da mesma com atividade bactericida, fungicida, viricida e inseticida. É importante recorrer à utilização de antimicrobianos derivados de produtos químicos não apenas ao nível da área da farmacologia mas também na industrial alimentar, cosmética e higiene (Hutschenreuther *et al.*, 2010).

Deste modo, a planta *Cistus ladanifer*, abundante na Península Ibérica, pode ser considerada uma fonte extremamente promissora de compostos antimicrobianos (Morales-soto *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Descrição *Lippia multiflora*



**Figura 2** – Imagem de *Lippia multiflora* [Consultado e adaptado em <https://innspubnet.wordpress.com/tag/lippia-multiflora/>, a 4 de maio de 2019].

A *Lippia multiflora* é uma planta que pertence à família Verbenaceae, crescendo essencialmente, no seu estado selvagem, na África Central e Oriental (Jim, S. *et al.*, 2010). Apresenta inúmeras qualidades e é colhida dependendo do efeito que se deseja obter. Por exemplo, na Costa do Marfim, sabe-se que apresenta vantagens tanto a nível alimentar, utilização na comida, substituto de chá e para usos na medicina tradicional (Pascual, M.E. *et al.*, 2001).

No caso particular da planta em estudo são-lhe conhecidas inúmeras propriedades nomeadamente, anti-infeciosas, antitússicas, sedativas, anti espasmos, sendo também utilizada contra inflamações brônquicas, desordens gastrointestinais, entre outras (Etou-Ossibi, A.W. *et al.*, 2005) (Menut, C. *et al.*, 1993) (Oussou, K.R. *et al.*, 2008).

Por outro lado, propriedades bacteriostáticas têm-se constatado no seu extrato no estado aquoso. Estudos em torno da *Lippia multiflora* continuam a ser realizados mas pensa-se que as suas atividades terapêuticas estejam relacionados com a presença dos terpenos, sendo os mesmos constituintes importantes dos óleos essenciais da planta (Soro *et al.*, 2015).

### 1.2.3. Descrição *Eucalyptus globulus*



**Figura 3** – Imagem de *Eucalyptus globulus* [Consultado e adaptado em <https://www.indiamart.com/proddetail/eucalyptus-globulus-oil-16467287173.html>, a 4 de maio de 2019].

As plantas de Eucalipto têm sido utilizadas na medicina tradicional desde há milhares de anos na Austrália. Os especialistas no estudo de plantas servem-se das folhas das mesmas com o intuito de obter resultados medicinais em diversas patologias, como feridas e infeções provocadas por fungos (Coppen, J. J. W *et al.*, 1992).

Nos dias que correm, os extratos das folhas, mais concretamente os óleos essenciais presentes nestas, são usados na perfumaria bem como na cosmética. Contudo, começou a perceber-se que os óleos extraídos das folhas da planta *Eucalyptus globulus* apresentam certas atividades terapêuticas como, por exemplo, antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e ainda antimicrobianas (González-Burgos. E *et al.*, 2018) (Gilles, M. *et al.*, 2010) (Aldoghaim, Flematti and Hammer, 2018)

Dado este facto, torna-se importante o estudo da planta em causa.

#### **1.2.4. Descrição *Mentha spicata***



**Figura 4** – Imagem de *Mentha spicata* [Consultado e adaptado em [https://www.banggood.com/30PCS-Mentha-Spicata-Spearmint-Seeds-Perennial-Flower-p923483.html?cur\\_warehouse=CN](https://www.banggood.com/30PCS-Mentha-Spicata-Spearmint-Seeds-Perennial-Flower-p923483.html?cur_warehouse=CN), a 4 de maio de 2019].

O género *Mentha* pertence à família Lamiaceae e inclui mais de 30 espécies de plantas. Estas apresentam características de crescimento, aroma e habitats muito distintos, dependendo da zona onde crescem (Celenk, S. *et al.*, 2008) (Shasany, A. *et al.*, 2005).

Várias espécies da planta em questão são utilizadas na medicina popular não só como agentes aromáticos mas também com finalidades terapêuticas (Asekun, O. *et al.*, 2005). Recentemente, houve um aumento de interesse na *Mentha spicata* dado os seus óleos essenciais apresentarem características farmacológicas devido aos seus metabolitos secundários bioativos. Esta atividade pode ser relacionada com efeitos antissépticos, sedativos, analgésicos, anestésicos ou ainda anti-inflamatórios (Bakkali, F. *et al.*, 2008) (Edris, A, 2007).

Note-se que várias partes das plantas podem ser utilizadas para a obtenção dos óleos essenciais nomeadamente as flores, folhas, sementes, raízes, caules, casca e até a madeira (Bardweel, S. K *et al.*, 2014) (Bardaweel *et al.*, 2018)

### **1.3. Microbiologia**

A microbiologia é considerada uma ciência à qual estão conectados dois temas fundamentais, nomeadamente, a compreensão do mundo dos microrganismos microscópicos e a sua potencial ação para o benefício do ser humano, bem como do planeta Terra (Madigan *et al.*, 2012).

Os microrganismos desenvolveram-se há milhões de anos na Terra, antes de qualquer outra forma de vida, antecipando-se às plantas e animais. A primeira pessoa a observar estes organismos microscópicos foi Anton Van Leewenkoek (1632-1723) através do aperfeiçoamento de inúmeros microscópios. Outro marco muito importante na história da microbiologia foi a descoberta revolucionária de Louis Pasteur e os conhecidos postulados de Koch (Madigan *et al.*, 2012).

Sabe-se que os microrganismos representam as formas mais pequenas de vida; contudo, constituem a maior parte da biomassa da Terra e realizam grande parte das reações químicas necessárias para a sobrevivência dos organismos superiores. Por exemplo, na ausência de oxigénio, formas de vida superiores nunca teriam evoluído e sobrevivido. É

importante realçar que o oxigénio que o ser humano respira provém da atividade microbiana de determinados microrganismos. Ademais, os humanos, animais e plantas estão estritamente ligados a atividades de microrganismos para reciclar nutrientes essenciais e degradar matéria orgânica. Estes seres constituem um apoio fulcral para a manutenção da vida no nosso planeta (Madigan *et al.*, 2012).

Por outro lado, nem tudo é positivo, uma vez que grande parte de todos os seres vivos considerados “superiores”, tais como os animais, plantas ou, ainda, os seres humanos estão sujeitos a ser parasitados, colonizados, “infetados” ou “agredidos” por estes organismos. Ao longo da história, inúmeras patologias foram aparecendo e, sabe-se hoje, foram provocadas pela ação destes minúsculos seres vivos (Madigan *et al.*, 2012).

Neste momento é sabido que o mundo dos microrganismos é muito vasto e diversificado sendo que, os mesmos, estão divididos em grupos dependendo das suas especificidades e características. Hoje em dia existem diversas áreas de estudo dentro da microbiologia, como por exemplo a micologia, ciência que estuda os fungos, a bacteriologia, responsável pelo estudo e conhecimento das bactérias, a virologia, ciência inerente aos vírus, a ficologia, sendo esta responsável pelo estudo de algas, ou a protozoologia que estuda os protozoários. Com o avanço da ciência e do conhecimento, mais áreas poderão vir a surgir (Madigan *et al.*, 2012).

## **1.4. Caracterização da célula bacteriana**

Grande parte dos organismos vivos são constituídos apenas por uma única célula. Através da utilização da microscopia convencional foi possível classificar os organismos em dois grandes grupos baseando-se apenas na sua estrutura celular: organismos eucariotas e os procariotas. A grande diferença entre estes dois grupos está na compartimentação dos organelos celulares. Assim sendo, os eucariotas apresentam, por exemplo, *um* compartimento intracelular onde está inserido o seu material genético. Por oposição, os procariotas não possuem compartimento no qual se contenha o material genético. Consideram-se, assim, os fungos, animais e plantas, como eucariotas e, por outro lado, bactérias e arqueias como procariotas (Madigan *et al.*, 2012).



Geralmente os organismos procarióticos são pequenos e simples, estão presentes no meio ambiente isolados ou em comunidades organizadas, mas de vida livre, ao contrário dos organismos multicelulares. Podem apresentar diversas formas, como por exemplo esféricas, bastonete e espiral. Uma particularidade inerente a quase todo este grupo de microrganismos é a presença de uma capa protetora, designada de parede celular, responsável também pela sua morfologia. A referida capa protetora situa-se sobre a membrana plasmática que envolve todos os organelos. A parede celular das bactérias é formada, essencialmente, por uma macromolécula, o peptidoglicano, fundamental para a sua proteção. Através da análise química da macromolécula anteriormente referida é possível distinguir dois tipos de bactérias, bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. Com esta análise, torna-se muito mais fácil entender a correta administração e ação de antibióticos no combate às mesmas. Porém, as arqueobactérias não possuem peptidoglicano, mas contêm proteínas e/ou polissacáridos na constituição da parede. É de extrema importância salientar que as células procarióticas vivem em diversos nichos, mesmo nas condições mais hostis e também apresentam capacidades bioquímicas extraordinárias em grau superior às células eucarióticas (Madigan *et al.*, 2012).

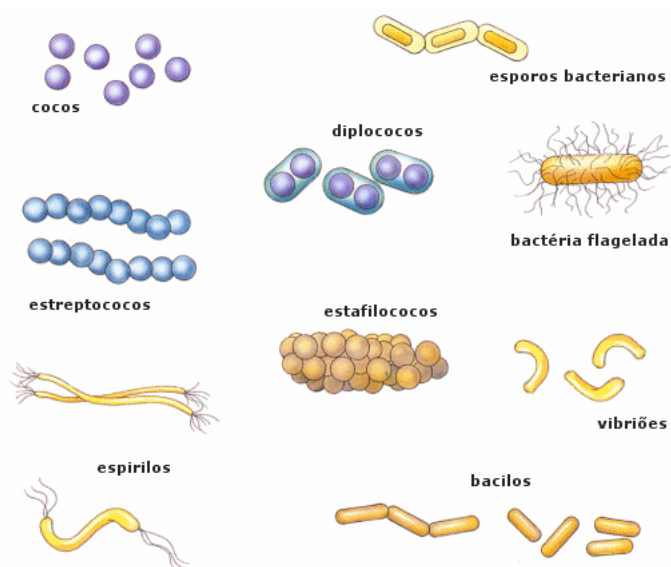
## **1.5. Bacteriologia**

A bacteriologia é um dos ramos da microbiologia. Esta área da ciência tem por base o estudo das bactérias as quais pertencem ao domínio procariota. Tal classe de microrganismos foi uma das primeiras a existir no planeta Terra (Madigan *et al.*, 2012).

As bactérias são microrganismos que apresentam características que os distinguem dos seres vivos superiores. O domínio procariota compreende, pois, organismos microscópicos, com uma capacidade considerável para a absorção de nutrientes e transformação dos mesmos de forma muito rápida, com elevada reprodutibilidade, enorme potencialidade de adaptação com resposta rápida a fatores abióticos e bióticos encontrando-se distribuídos por variadíssimos ambientes(‘Introducing Bacteria’, 2017).

Os microrganismos agora abordados são seres unicelulares, isto é, organismos que apenas possuem uma única célula. Através do avanço da microscopia foi possível distinguir vários

tipos de bactérias através da sua morfologia. Existem, portanto, bactérias com forma de cocos, bastonetes ou bacilos e ainda espirilos. As bactérias com a forma de cocos, de acordo com a sua divisão celular, podem agrupar-se em diferentes formas nomeadamente: diplococos, quando agrupados dois a dois; estreptococos quando se agrupam de forma similar a um colar de pérolas; tétradas quando se unem quatro a quatro; sarcinas no caso de se agruparem oito a oito e, por fim, estafilococos, agrupando-se, neste caso, de forma aleatória, assemelhando-se a um cacho de uvas. Por sua vez, os bastonetes ou bacilos, podem ser longos ou curtos com a extremidade reta ou arredondada ou também em forma de vírgula. Geralmente vivem de forma isolada, contrariamente às bactérias, estas com a forma de cocos. Por último, os microrganismos com forma de espirilo possuem o formato de hélice ou espiral. Entre eles, estes apresentam diferenças ao nível do tamanho, amplitude e comprimento das espirais ('Introducing Bacteria', 2017).



**Figura 5** – Determinadas morfologias inerentes a bactérias [Consultado e adaptado em [https://www.cientic.com/tema\\_monera\\_img5.html](https://www.cientic.com/tema_monera_img5.html), a 4 de maio de 2019].

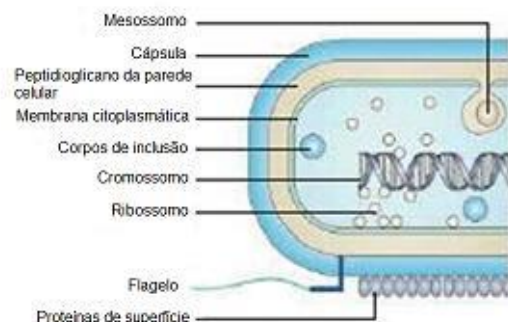
### **1.5.1. Distinção entre bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas**

A utilização da microscopia eletrônica e o desenvolvimento de métodos para a purificação da parede celular foram cruciais para o respetivo entendimento. Deste modo, percebeu-se que a parede celular é constituída por macromoléculas (WEIDEL, FRANK and MARTIN, 1960). Também, desde cedo, conseguiu concluir-se que a parede celular tem um papel ativo e importante na forma que as células apresentam (Salton and Horne, 1951a, 1951b). Estas técnicas iniciais foram fundamentais para definir a natureza glicopeptídica da parede celular, que ficou conhecida como camada de peptidoglicano (de Pedro and Cava, 2015).

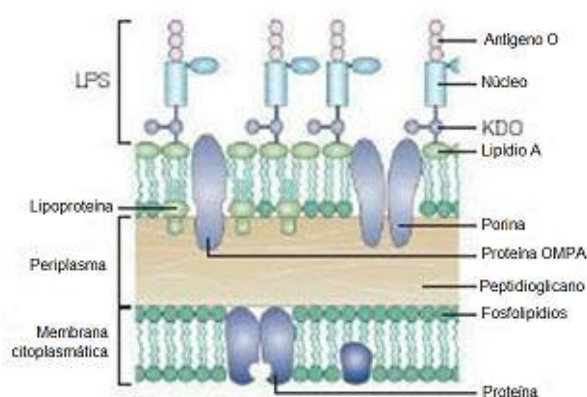
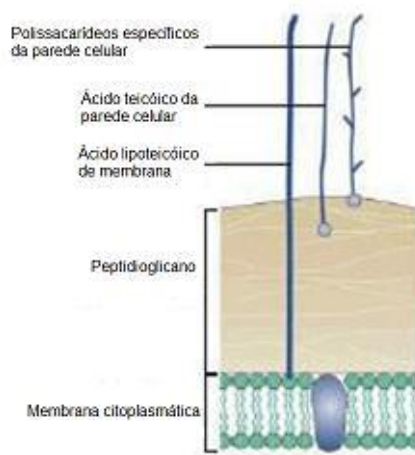
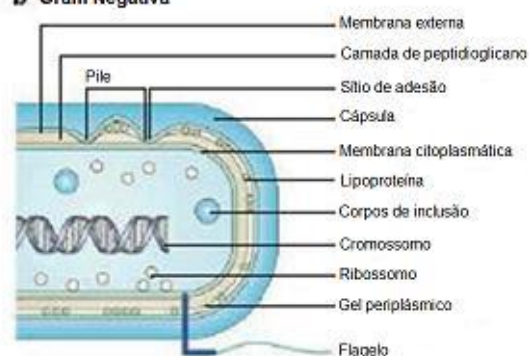
Em 1884 o microbiologista dinamarquês, Hans Christian Gram, desenvolveu uma técnica de coloração que permite classificar e distinguir a maioria das bactérias em dois grandes grupos, ou seja, bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (Silhavy, 2016). Hoje em dia esta técnica de coloração é utilizada em todos os laboratórios que pretendem classificar bactérias devido ao seu poder de distinção. Desde cedo ficou demonstrado que a coloração de Gram deteta diferenças fundamentais na parede celular bacteriana dos dois tipos de bactérias. As bactérias Gram-positivas coram de roxo e as bactérias Gram-negativas coram de vermelho. Contudo, uma melhor elucidação só foi possível ser apreendida com o aparecimento da microscopia eletrônica. Assim sendo, conclui-se que a parede celular das bactérias Gram-positivas é espessa e rígida, constituída por peptidoglicano, o qual representa cerca de 50% a 70% da estrutura. Relativamente às bactérias Gram-negativas, estas apresentam uma parede celular na qual o peptidoglicano se dispõe em forma de monocamada, localizada no periplasma. Esta camada está localizada entre duas membranas, a membrana externa e a membrana interna. A membrana externa é constituída, essencialmente, por fosfolípidos, dos quais se destacam os lipopolissacarídeos, enquanto que a membrana interna ou citoplasmática contém fosfolípidos, enzimas digestivas e proteínas (Silhavy, 2016).

O peptidoglicano desempenha um papel fundamental na manutenção da forma celular e resistência, fornecendo locais de ligação para fatores de virulência expostos à superfície e, também, evita modificações na pressão osmótica interna (Nikolaidis, Favini-Stabile and Dessen, 2014).

**a Gram Positiva**

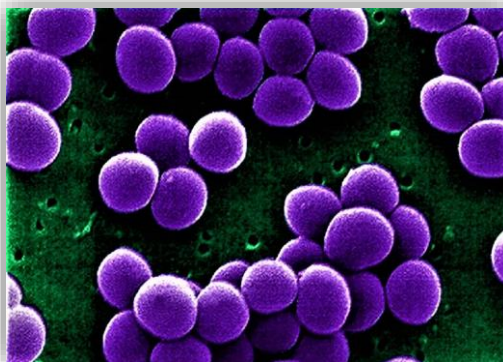


**b Gram Negativa**

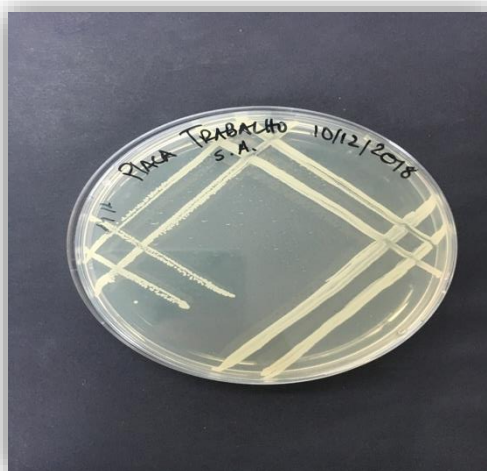


**Figura 6** – Representação da constituição e estruturas das paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas [Consultado e adaptado em <https://essaseoutras.com.br/bacterias-gram-positiva-e-negativa-resumo-esquema-organelas-funcoes/>, a 4 de maio de 2019].

### 1.5.2. *Staphylococcus aureus*



**Figura 7** – *Staphylococcus aureus* [Consultado e adaptado em <https://e-liposuction.com/staphylococcus-aureus/> a 4 de maio de 2019].



**Figura 8** – *Staphylococcus aureus* cultivado em placa.

A bactéria conhecida como *Staphylococcus aureus* preocupou o homem durante séculos (Kloos W.E. 1997). Porém, este microrganismo, apenas foi descrito pela primeira vez em 1882, pelo cirurgião escocês Sir Alexander Osgton como *Staphylococcus* (do grego staphylos, com o significado de “uva” e, kokkos, com o significado de “semente”) (Wilson, 1987). Após dois anos, em 1884, Friedrich J. Roesenbach, descreveu dois tipos de colônias pigmentadas da mesma bactéria e propôs a nomenclatura *Staphylococcus albus* (em latim “branco”) e *Staphylococcus aureus* (em latim “aurum”, significando ouro). Até

aos dias de hoje, esta estirpe continua a surpreender médicos e cientistas, infectando e dizimando milhões de pessoas (Stryjewski and Corey, 2014).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria que pertence ao grupo dos cocos Gram-positivos. O seu tamanho varia entre os 0,5  $\mu\text{m}$  e 1,5  $\mu\text{m}$ , é imóvel, com forma esférica, não esporulada, é catalase-positiva, ou seja, produz a enzima catalase, é oxidase negativa e, também, maioritariamente não apresenta cápsula. É de realçar que é uma bactéria anaeróbia facultativa e, deste modo, tanto cresce por respiração aeróbia como por fermentação. Quando cresce por fermentação o ácido láctico é o principal composto que a mesma produz. Também a maioria das estirpes de *S. aureus* tem a capacidade de produzir a enzima coagulase. Hoje em dia sabe-se que as estirpes de *S. aureus* apresentam um vasto crescimento em meios de agar comuns e, também, em meios seletivos e diferenciais. Por outro lado, a otimização de crescimento requer uma temperatura de 37 °C, pH 7 e tempo de incubação aproximadamente entre 18 a 24 horas. Por exemplo, um meio seletivo utilizado para o crescimento da bactéria em questão é o manitol-sal (Somerville and Proctor, 2009). O microrganismo em questão é patogénico, causando infeções agudas e crónicas graves, através dos fatores de virulência que apresenta, particularmente uma complexa rede de transdução de sinal e sistemas regulatórios. Contudo, apesar de ser patogénico, também é uma bactéria comensal do ser humano, colonizando cerca de 30% da população adulta saudável (Gorwitz *et al.*, 2008), estando presente, maioritariamente, nas fossas nasais, garganta e pele. Não obstante, se as barreiras naturais do ser humano estiverem comprometidas, o *S. aureus* tem a capacidade de causar infeções locais ou mais agudas/extensas. Sendo assim, é importante referir que o *S. aureus* promove infeções nosocomiais que podem ir de simples infeções, como acne, a infeções mais graves como pneumonia ou meningites. A investigação tem vindo a debruçar-se amplamente nas infeções nosocomiais provocadas por este agente patogénico, visto que, quando não tratadas, podem provocar bacteriemia, ou seja, a presença das mesmas no sangue (Kiedrowski *et al.*, 2016)

Ademais, a bactéria em estudo, presente em hospitais, frequentemente apresenta resistência a inúmeros antibióticos hoje em dia utilizados, sendo cada vez mais necessário o estudo de alternativas aos mesmos (Stryjewski and Corey, 2014).

### 1.5.3. *Escherichia coli*



**Figura 9** – *Escherichia coli* [Consultado e adaptado em <https://www.bbc.com/news/health-13639241>, a 4 de maio de 2019].

A *Escherichia coli*, mais conhecida como *E. coli* pertence a um grupo filogenético parcialmente homogêneo dentro da Gammaproteobacteria. É uma bactéria Gram-negativa, apresenta forma de bastonete não formando esporos, é aeróbia facultativa, pode não apresentar mobilidade mas, quando a tem, tal deve-se à presença de flagelos. A *E. coli* é uma bactéria entérica, sendo a mais conhecida. É oxidase negativa e, relativamente às necessidades nutricionais, é um organismo simples e fermenta açúcares para uma variedade de produtos finais. Cresce a temperaturas entre 18 °C a 44 °C, sendo a temperatura de maior proliferação a de 37 °C, idêntica à temperatura da maioria dos mamíferos. A bactéria em apreço habita o trato intestinal de humanos e de outros animais de sangue quente, embora não seja um microrganismo neles predominante. Desempenha papel fundamental no trato intestinal, tal como na síntese de vitaminas, em especial a vitamina K. Como é um organismo aeróbio facultativo pensa-se que ajuda a consumir o oxigénio presente no intestino grosso, tornando-o anóxico (Madigan *et al.*, 2012).

A *E. coli* pode ser transmitida através do consumo de alimentos contaminados, como carne moída crua ou mal cozida, leite não pasteurizado ou água contaminada. A sua presença comum nos intestinos e fezes, levou a que fosse utilizada como indicadora de poluição fecal e contaminação de água. (Tortora *et al.*, 2004). Existem estirpes da *E. coli* consideradas selvagens, como por exemplo a estirpe 0157:H7 que causa surtos

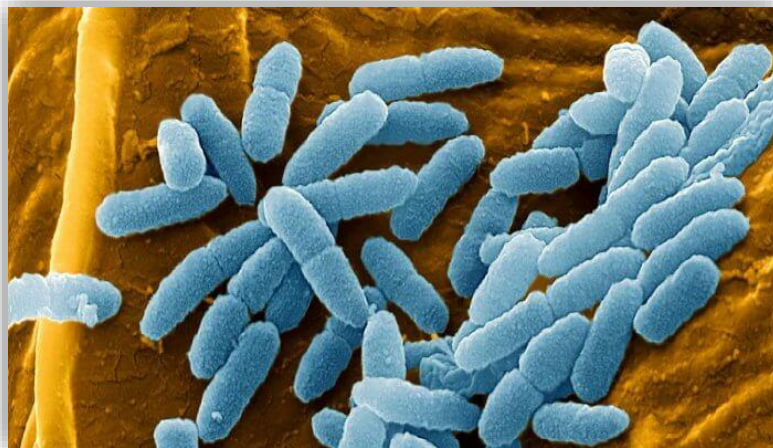


esporádicos, colocando em risco a vida do homem, devido à produção de uma enterotoxina (Madigan *et al.*, 2012).

A *E. coli* está associada a uma variedade de doenças, incluindo gastroenterites, meningites, infecções extraintestinais. Quando são referidas infecções extraintestinais incluem-se nelas, por exemplo, a bacteremia, meningite neonatal, as infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais (Rudan, 1999).

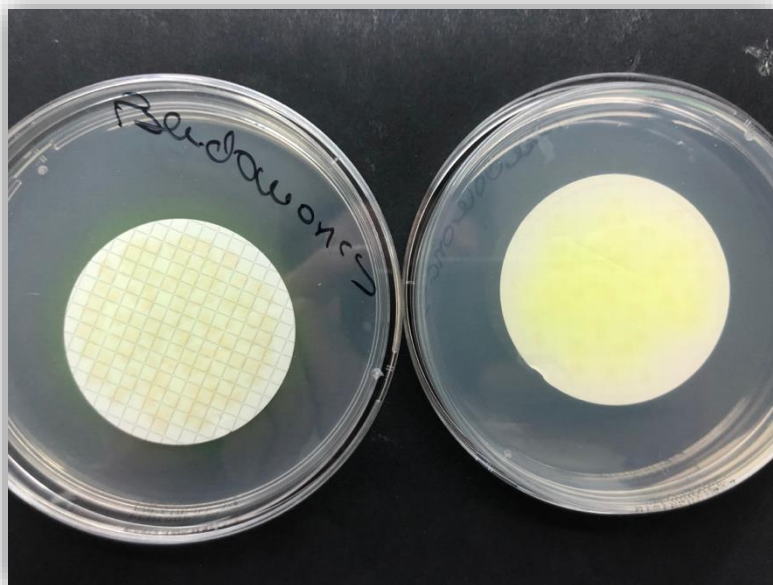
Posto isto, urge concluir que ela é uma bactéria a ter em conta dado a sua elevada taxa de virulência e incidência. Desta forma, o estudo de novos agentes antimicrobianos torna-se não só pertinente, mas ainda necessária para a combater.

#### **1.5.4. *Pseudomonas aeruginosa***



**Figura 10** – *Pseudomonas aeruginosa* [Consultado e adaptado em [tps://proeconomy.com/pseudomonas-aeruginosa-in-healthcare/](https://proeconomy.com/pseudomonas-aeruginosa-in-healthcare/), a 4 de maio de 2019].





**Figura 11** – *Pseudomonas aeruginosa* cultivado em placa.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa que apresenta a forma de bacilo linear ou curvo. Por outro lado, é aeróbia, isto é, o seu metabolismo é respiratório, nunca fermentativo, contudo tem a capacidade de crescer na ausência de oxigénio se no ambiente existir dióxido de azoto e apresenta motilidade através de flagelos. A sua temperatura ideal de crescimento ronda os 37 °C tendo a capacidade de desenvolver-se a temperaturas superiores. Sobrevive a concentrações de salinidade elevadas, a corantes, também a antissépticos e, neste momento, a uma grande maioria de antibióticos hoje em dia utilizados (Madigan *et al.*, 2012).

Com efeito, convém salientar que a importância do estudo desta bactéria, deve-se ao facto de ser um patógeno altamente resistente e oportunista. Na verdade, não é excessivo sublinhar, que ela exibe elevada resistência a antibióticos devido à barreira de permeabilidade na membrana externa. É um microrganismo relativamente ao qual as infeções estão a aumentar, tanto em meios hospitalares como na comunidade em geral. Tem vindo a ser relatada como um dos principais patógenos nosocomiais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos (Tin *et al.*, 2009). Este patógeno está implicado em infeções respiratórias, urinárias, gastrointestinais, otites, bacteremias, entre outras (Morita, Tomida and Kawamura, 2013). O rácio de mortalidade de algumas infeções referidas excede os 60%. Neste momento é considerado um de seis patógenos relativamente aos

quais urge descobrir, rapidamente, novos métodos antimicrobianos para o combater. Assim sendo, é necessária a focagem no estudo do seu crescimento, desenvolvimento e capacidade de sobrevivência para que seja possível identificar novas estratégias de combate contra a *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2015)..

## **1.6. Atividade dos agentes antimicrobianos**

De um modo geral, agente antimicrobiano é o nome atribuído à substância sintética ou composto natural usado para matar microrganismos ou inibir o crescimento microbiano. Estes agentes incluem antibióticos, antissépticos e desinfetantes (Madigan *et al.*, 2012)

Dependendo do organismo alvo, os agentes antimicrobianos responsáveis por matar microrganismos são designados por bactericidas, fungicidas e viricidas. No caso particular das bactérias, existe uma outra subclasse dos bactericidas, sendo a mesma denominada bacteriolítica. Por outro lado, os responsáveis pela inibição do crescimento microbiano são chamados bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos (Madigan *et al.*, 2012)

Focando-nos nas bactérias, os agentes bactericidas promovem a morte celular daquelas através de mecanismos como, por exemplo, a inibição irreversível da replicação do DNA. Por outro lado, os agentes bacteriostáticos inibem o crescimento das bactérias, atuando, principalmente, na inibição do metabolismo bacteriano. Os bacteriolíticos, por sua vez, ao provocarem a morte bacteriana, fazem-no através da ativação de cascatas que levam à lise celular (Belenky *et al.*, 2015; Homma *et al.*, 2016; Mussato *et al.*, 2017).

A este propósito, utilizaremos como termo de comparação, para o nosso estudo, dois antibióticos bactericidas, a Gentamicina e a Penicilina G.

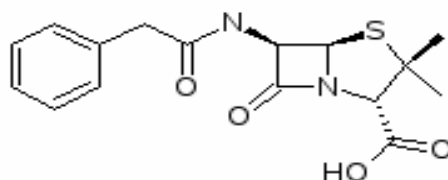
Já se conhece também que compostos naturais como os óleos essenciais, podem possuir uma ou várias características anteriormente definidas como atividade antimicrobiana (Mussato *et al.*, 2014).

### 1.6.1. Penicilina G

Um dos antibióticos naturais mais antigo e mais conhecido, a Penicilina G, é um composto obtido a partir do metabolismo do fungo *Penicillium notatum*. Pertence à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que possui um anel  $\beta$ -lactâmico de quatro membros. Para além da Penicilina G, este grupo inclui diversos antibióticos, tais como, as cefalosporinas, os carbapenenos e os monobactâmicos (Sousa, 2006).

É de realçar que a Penicilina G, devido às suas propriedades antimicrobianas, sendo produzida pelo microrganismo anteriormente mencionado, levou a que, o mesmo, nos dias de hoje, para satisfazer as elevadas necessidades da sua utilização, fosse geneticamente modificado dando origem ao microrganismo *Penicillium chrysogenum*. Assim, este último, permite uma produção em maior escala da benzilpenicilina, um derivado da Penicilina G (Rolinson *et al.*, 2007).

A Penicilina G é um antibiótico bactericida, atuando ativamente em microrganismos em crescimento e divisão. A sua ação incide na parede celular bacteriana, inibindo as enzimas responsáveis pela síntese do peptidoglicano. Deste modo, a parede celular bacteriana torna-se enfraquecida levando à ativação de enzimas autolíticas que culminam na lise da bactéria alvo (Miller, 2002). Possui um maior espectro de ação contra diversas bactérias Gram positivas, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que não produz beta lactamases, enzimas responsáveis pela degradação do anel  $\beta$ -lactâmico. Porém, as Penicilinas sintéticas mais recentes, como as aminopenicilinas, levaram a um aumento do seu espectro de ação, que incluiu, agora, alguns microrganismos Gram negativos, como algumas estirpes de *E. coli* que ainda não desenvolveram resistência (Raynor BD, 1997).



penicilina G

**Figura 12** – Penicilina G [Consultado e adaptado em <http://aneste.org/maytenus-ilicifolia-espinheira-santa-os-produtos-naturais-que.html/>, a 4 de maio de 2019].

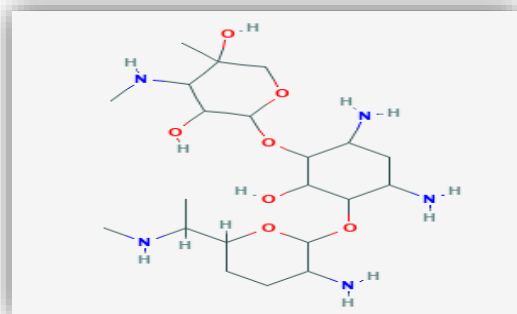
## 1.6.2. Gentamicina

A Gentamicina pertence à classe de antibióticos designados de aminoglicosídeos. O mencionado antibiótico atua contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Como neste estudo foram utilizadas bactérias Gram-negativas, nomeadamente a *E. coli* (ATCC 25922) e a *P. aeruginosa* (ATCC 10145= e uma Gram-positiva, a bactéria *S. aureus* (ATCC 25923), achou-se pertinente a utilização da Gentamicina, visto que, aquele, apresenta uma ação de largo espectro como, aliás, oportunamente já deixamos referido (Sousa, 2006).

Para que seja possível uma bactéria reproduzir-se é estritamente necessário que a síntese proteica ocorra e, por sua vez, as proteínas obtidas tenham diversas funções como, por exemplo, estruturais ou enzimáticas. Neste caso em particular, a Gentamicina, é um antibiótico inibidor da síntese proteica, isto é, atua no interior da bactéria, focando-se na subunidade ribossomal 30S, bloqueando, pois, a síntese das proteínas e assim promovendo a inatividade da célula (Berg *et al.*, 2002).

Dentro da classe de antibióticos que inibe a síntese de proteínas, a maior parte tem ação bacteriostática à exceção dos aminoglicosídeos, sendo os mesmos bactericidas (Madigan *et al.*, 2012).

Contudo, as infeções nosocomiais provocadas pelos microrganismos anteriormente citados têm vindo a aumentar dado que estes começam a tornar-se resistentes à Gentamicina pela sua utilização em taxas elevadas (Sousa 2006). Pelo que, estudos com compostos alternativos a antibióticos são de extrema importância.



**Figura 13** – Gentamicina [Consultado e adaptado em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gentamicin#section=Structures>, a 4 de maio de 2019].

## 1.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

Atualmente existem várias técnicas, *in vitro*, para possibilitar a determinação da atividade antimicrobiana de um determinado composto. Tais técnicas estão relacionadas com a observação da capacidade de crescimento de um microrganismo na presença de um fármaco, por exemplo. No que diz respeito aos óleos essenciais as técnicas mais utilizadas para a avaliação desta mesma atividade são as de diluição em caldo, tanto macrodiluições como microdiluições; o método de perfuração de cavidades de agar; o método do efeito do vapor; o método de cilindros de aço inoxidável e difusão por discos. Contudo, nesta dissertação, apenas foram realizadas algumas das técnicas nomeadamente: macrodiluição, método de cavidades cilíndricas e método do efeito vapor (Jorgensen and Ferraro, 2009).

Porém, todos estes métodos são mais complexos quando se testam óleos essenciais. Os óleos apresentam características muito próprias como a volatilidade, a sua complexidade química e a sua insolubilidade em água, sendo que, tais características, interferem com a autenticidade significativa dos resultados obtidos. O modo de crescimento dos microrganismos utilizados requer meios de cultura constituídos por água, essencial ao crescimento das bactérias em estudo (Nascimento, Nascimento and Rodrigues, 2007).

Deste modo, para melhorar a qualidade dos referidos testes para os óleos essenciais, começaram a utilizar-se solventes, detergentes ou emulsionantes como, por exemplo, o dimetilsulfóxido, o Tween 20, o Tween 80 ou até mesmo o etanol. O intuito da citada utilização será tornar mais fácil a dispersão do óleo no meio de cultura e tentar diminuir a sua hidrofobicidade. (Baydar *et al.*, 2004; Bruni *et al.*, 2004). Não obstante, não será de excluir que podem ocorrer interações, tanto entre o agente emulsionante com o óleo, como entre o agente emulsionante e o microrganismo teste. Deve ter-se sempre em consideração a escolha adequada do agente emulsionante (Takara *et al.*, 2004).

## **1.8. Sinergismo e antagonismo entre os compostos dos óleos essenciais**

Hoje em dia sabe-se que, na constituição de uma planta, existem inúmeros compostos que podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana. Contudo, ainda é difícil inferir sobre qual o composto ou os compostos a que é atribuída a atividade pretendida. Porém, existem três hipóteses: a ação individual de apenas um composto, a ação de vários compostos potenciando a ação da atividade antimicrobiana ou, por último, quando a ação de dois ou mais compostos em conjunto diminua a ação antimicrobiana do óleo da planta testada (Madigan *et al.*, 2012).

No entanto, na ciência, devido aos elevados custos, após a extração dos compostos, testam-se aqueles que estão em maior abundância, dado pensar-se que são eles que apresentam o efeito esperado. Os componentes de referência que se encontram em maior concentração espelham, geralmente, as características biológicas e biofísicas dos óleos essenciais. Contudo, esta escolha é apenas realizada devida à sua concentração no óleo. Desta forma, é questionável que a atividade dos principais componentes de um óleo essencial seja condicionada por outros. Comparando a ação dos óleos essenciais com a ação dos compostos isolados pode inferir-se qual possui uma maior atividade. Deste modo, é possível verificar sinergismo quando o óleo essencial tem maior eficiência do que quando testado apenas um composto isolado. Antagonismo é o oposto, isto é, quando um composto isolado tem maior eficácia que o óleo essencial (Rocha *et al.*, 2012).

Devido aos inumeráveis compostos presentes num óleo essencial, o desejável seria o estudo total dos componentes e não apenas dos compostos maioritários. Por outro lado, sabe-se ser, essa, uma tarefa árdua e quase impossível, uma vez que as probabilidades são infundáveis (Henri, Bassolé and Juliani, 2012; Rocha *et al.*, 2012).

## **1.9. Métodos para analisar a atividade antimicrobiana**

### **1.9.1. Métodos de difusão em placa de agar**

Os métodos de difusão em placa de agar são considerados métodos físicos, dado que, um determinado microrganismo é confrontado com uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido (no caso do projeto em questão o meio Mueller-Hinton). Posto isto, a avaliação da atividade da substância presente no meio de cultura é realizada através da comparação do halo de inibição em torno do disco contendo a substância teste com o halo de inibição de uma substância aonde já é conhecida a sua atividade antibacteriana (Pinto *et al.*, 2003; Barry & Thornsberry, 1991).

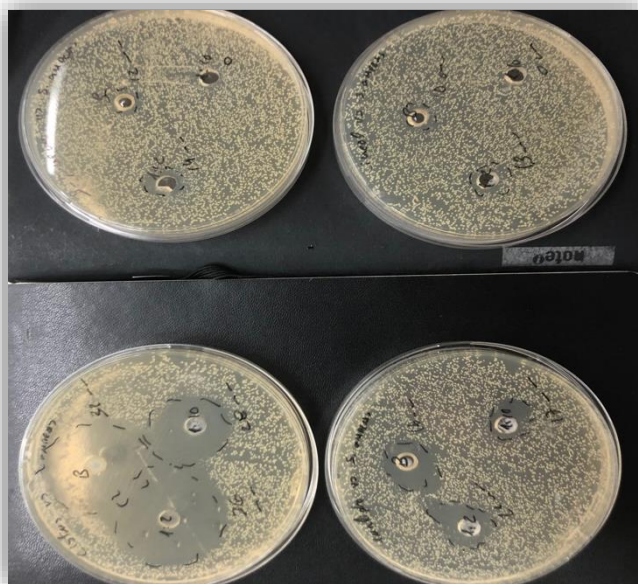
Para a realização destes testes é necessário assegurar que a preparação da placa de Petri, a densidade do inóculo, o tempo de incubação, medições dos halos e a temperatura de incubação sejam realizadas de forma exímia. É preciso também ter em atenção as contaminações cruzadas a fim de que os resultados obtidos sejam fiáveis. Todos estes fatores interferem com a fiabilidade dos resultados (Moody *et al.*, 2004; Springfield *et al.*, 2003; Ayres *et al.*, 2008).

A aplicação do método de difusão limita-se a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (Barry & Thornsberry, 1991). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou igual ao diâmetro do halo do controle positivo subtraído de 3 mm; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o diâmetro do halo do controle positivo subtraído de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterapêutico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos, neste caso, DMSO, (Karaman *et al.*, 2003; Springfield *et al.*, 2003).

No trabalho aqui em causa os métodos de difusão em placa de agar realizados foram os métodos por perfuração de cavidades cilíndricas e o método efeito de vapor.

### 1.9.2. Perfuração de cavidades cilíndricas

Na técnica de perfuração de cavidades cilíndricas ou poços, o meio Mueller-Hinton é perfurado com um instrumento de aço inoxidável, devidamente esterilizado. Este contém uma estrutura cilíndrica oca que possibilita a remoção do agar, já inoculado, obtendo-se, assim, um poço ou cavidade com 4 mm de altura e 5 mm de diâmetro que irá ser preenchido com o composto que se pretende testar (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).



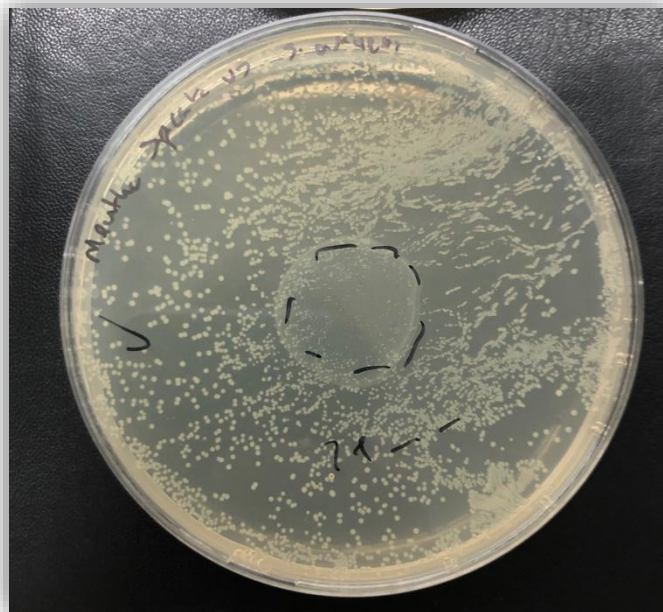
**Figura 14** – Exemplos de agar com cavidades, após ensaios realizados.

### 1.9.3. Efeito vapor do óleo essencial

O respetivo método serve para determinar se o vapor do óleo essencial apresenta atividade antimicrobiana sobre as espécies testadas. Para tal, numa placa de Petri já com o meio solidificado e com a espécie a testar inoculada, colocam-se 70  $\mu$ L da substância teste na



tampa da placa, ficando a mesma a servir como base da placa. A placa invertida vai a incubar a aproximadamente 37 °C, durante 24 horas. Após o período de incubação, observa-se a placa e se houve atividade antimicrobiana através da formação de um halo inibitório (Lisin *et al.*, 1999).



**Figura 15** – Exemplos de ensaios realizados pela técnica de vapor e o halo de inibição obtido.

#### **1.9.4. Método de diluição em caldo**

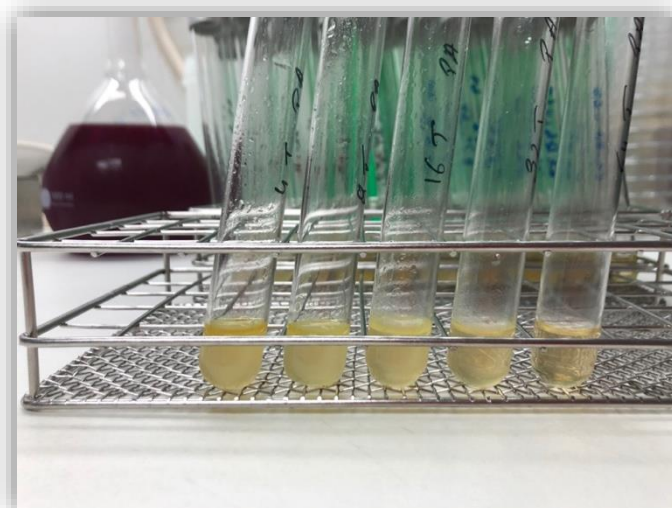
Relativamente a este tipo de método pode afirmar-se que o mesmo correlaciona a proporção do crescimento do microrganismo em meio líquido com a concentração da substância a analisar. Note-se que a avaliação deste mesmo método é realizada através da comparação com um padrão biológico de referência. Quando se elenca a palavra proporção neste método, a mesma é relativa a densidade de turbidez promovida pelo crescimento do microrganismo (Pinto *et al.*, 2003).

Através da utilização do método de diluição em caldo obtêm-se resultados quantitativos, não sendo os mesmos influenciados pela rapidez com que os microrganismos crescem.

Utiliza-se como controlo positivo o meio de cultura (caldo) com o antimicrobiano padrão, isto é, com um antibiótico conhecido e, também, na mistura, coloca-se a suspensão de microrganismos padronizada. Por outro lado, como controlo negativo, é usado o meio de cultura, o solvente orgânico, DMSO, e ainda a suspensão de bactérias padronizada (Sahm & Washington II, 1991). Este tipo de método pode ser abordado de diferentes formas, nomeadamente, microdiluição e macrodiluição. No projeto em causa realizou-se o método de diluição em caldo por macrodiluição.

### 1.9.5. Macrodiluição

O teste da macrodiluição requer a preparação de diluições seriadas de microrganismos em meio de cultura. Deste modo, é necessário preparar uma serie de tubos com as diluições desejadas. Por outro lado, é sempre preciso incluir um controlo positivo e negativo. Os tubos com o antibacteriano são inoculados com suspensões bacterianas padronizadas de  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias por mililitro. Posto isto, devem incubar-se os mesmos durante 24 horas a uma temperatura de 37 °C para observar se apresentam turbidez. Através da visualização dos tubos com turbidez é possível detetar crescimento bacteriano e, conseqüentemente, determinar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008; Mohammad *et al.*, 2016)



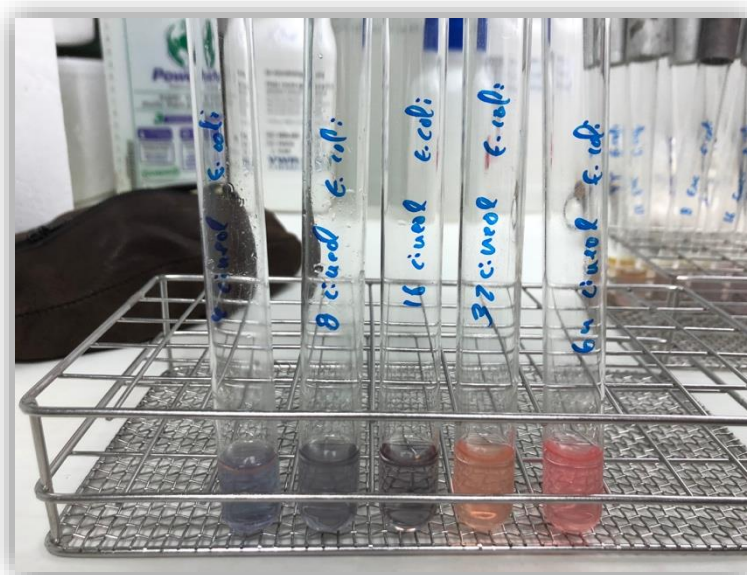
**Figura 16** – Exemplos de uma macrodiluição realizada.

**Nota** - Na macrodiluição representada na figura 16, torna-se muito difícil determinar a CMI a olho nu. Deste modo, recorre-se ao teste da resazurina.

### 1.9.6. Teste da rezasurina

O teste da resazurina, foi realizado pela primeira vez por Pesh e Simmert, em 1929 e é considerado um teste ideal para observar o crescimento celular e, conseqüentemente, para verificar a existência de contaminações bacterianas. É um teste simples, rápido e fiável. O que acontece neste método é que ocorre a redução da Resazurina (azul) a Resofurina (cor rosa) que, por sua vez, passa a Dehidroresofurina (incolor) (Pereira *et al.*, 2012).

Conclui-se, assim, que, no método em apreço, quando ocorre uma mudança de cor azul (estado oxidado), para rosa (estado reduzido), tal indica o crescimento bacteriano e, através da observação da mudança de cor é possível determinar a concentração mínima inibitória (Pombo, 2011)



**Figura 17** – Exemplos de uma macrodiluição realizada após a adição de resazurina.

## **1.10. Fatores que interferem com os métodos de atividade antibacteriana**

Atualmente, métodos para a investigação *in vitro* com óleos essenciais têm vindo a ser melhorados para que seja possível a obtenção de resultados mais viáveis dado que os óleos apresentam características muito específicas, como, por exemplo, a sua volatilidade e insolubilidade em água (Nascimento, Nascimento and Rodrigues, 2007). Deste modo, podem ser enumerados certos fatores passíveis de interferir com os métodos utilizados e, os mesmos, devem ser tidos em conta para que a realização da experiência seja o mais rigorosa possível. Podem ser discriminados como fatores interferentes na execução dos métodos, o meio de cultura, a disponibilidade de oxigénio, a padronização do inóculo, o pH e também as condições de incubação (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

### **1.10.1. Meio de cultura**

Este fator é de extrema importância dado que é essencial que promova o crescimento dos organismos teste e, por outro lado, que não contenha substâncias antagónicas que contrariem a atividade antimicrobiana que se pretende estudar (Nascimento, Nascimento and Rodrigues, 2007). Com o avanço da ciência e de estudos com óleos essenciais e a sua atividade antimicrobiana, conclui-se que o meio de cultura mais utilizado é o Mueller-Hinton (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008). Este meio é considerado o melhor para testes de suscetibilidade antibacteriana, uma vez que ficou provado que, nele, as bactérias apresentam uma maior taxa de reprodutibilidade (Baker, Hollis and Thornsberry, 1985).

### **1.10.2. Disponibilidade de oxigénio**

Os microrganismos variam de acordo com a sua necessidade e também tolerância ao oxigénio (O<sub>2</sub>). Podem ser distinguidos através da relação que apresentam com o O<sub>2</sub>. Através da capacidade metabólica as bactérias podem ser divididas em diferentes grupos, designadamente: aeróbias estritas, anaeróbias estritas, anaeróbias tolerantes, anaeróbias facultativas e microaerofilas. As bactérias aeróbias estritas necessitam de O<sub>2</sub> para o seu crescimento, as anaeróbias estritas não utilizam o O<sub>2</sub> para se desenvolver sendo este elemento químico tóxico para si, matando-as ou inibindo-as. Um outro grupo de bactérias são as anaeróbias tolerantes que têm capacidade de tolerar o oxigénio, mesmo que não o possam utilizar. Relativamente às anaeróbias facultativas apresentam, estas, dois tipos de metabolismo, sendo que, na presença de O<sub>2</sub>, utilizam-no. Porém, na sua ausência, conseguem realizar a fermentação ou respiração anaeróbia, possibilitando, deste modo, o seu crescimento em ambas as condições. Por último, as bactérias microaerofilas são capazes de crescer e desenvolver-se na presença de oxigénio mas apenas quando este elemento se encontra em níveis reduzidos em relação à concentração encontrada no ar (Madigan *et al.*, 2012)

### **1.10.3. Padronização do inóculo**

A padronização do inóculo é um requisito essencial para a boa prática laboratorial e, desta forma, a quantidade deve ser sempre estabelecida para cada método. Quando se pretende o crescimento em placa a quantidade de inóculo é acertada a 10<sup>6</sup> UFC/mL, através de uma diluição, garantindo-se o crescimento dos microrganismos teste para posterior avaliação dos halos de inibição (Sahm & Washington II, 1991).

Na preparação dos métodos utilizados na dissertação, nomeadamente método de diluição e difusão, a obtenção do inóculo deve ser realizada a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo teste. Utiliza-se, para tanto, o aparelho DENSIMAT – Densitómetro e certifica-se que o mesmo atinge o valor de 0,5 na escala de MacFarland, correspondendo a uma densidade de 10<sup>8</sup> UFC/mL (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008)

#### **1.10.4. pH**

O pH é um elemento sempre a ter em conta na medida em que existem microrganismos que crescem a diferentes níveis. De facto, há microrganismos acidófilos que requerem pH entre 1.0 a 5.0, microrganismos neutrófilos, cuja proliferação ideal corresponde a um pH entre 5.5 e 8.0, e ainda, os microrganismos alcalófilos que necessitam de um pH entre 8.5 a 11.5. Estes últimos apresentam, também, uma subcategoria, os alcalófilos extremos que apenas crescem a pH superiores a 10 (Madigan *et al.*, 2012).

Posto isto, diferentes microrganismos requerem diferentes necessidades. Assim sendo, várias condições devem ser propícias para o crescimento do microrganismo (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008; Mohammad *et al.*, 2016).

#### **1.10.5. Condições de incubação**

No caso dos métodos utilizados, a estufa para a incubação das bactérias deve estar entre 35-37 °C, visto que é a temperatura ideal para a inerente proliferação e crescimento das bactérias em análise. A homogeneidade da estufa terá sempre que ser garantida, pois as bactérias são sensíveis a pequenas variações (Güllüce, Ö̇ and Sahin, 2003; Chandrasekaran and Venkatesalu, 2004).

## 2. Objetivo

O principal objeto de estudo deste trabalho foi testar a capacidade antimicrobiana de compostos isolados, nomeadamente, o  $\beta$ -pineno, o Cineol e a S-(+)-carvona e também os óleos das plantas *Cistus ladanifer*, *Lippia multiflora*, *Eucalyptus globulus* e da *Mentha spicata*. Deste modo, procedeu-se à realização de metodologias práticas como, por exemplo, os métodos de difusão por poços em agar e pelo efeito de vapor em placa dos óleos, seguindo-se a medição dos respetivos halos de inibição. Posto isto, foram determinadas as Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentrações Mínimas Bactericidas (CMB) através do método de macrodiluição em caldo. Os microrganismos teste foram o *Staphylococcus aureus*, presente em abundância na pele do ser humano, a *Escherichia coli*, microrganismo representativo do trato intestinal dos animais superiores, incluindo o ser humano e, por último, a *Pseudomonas aeruginosa*, dado ser um agente microbiano ubíquo. Os resultados obtidos neste trabalho são comparados com antibióticos bem estudados como a Penicilina G e Gentamicina, procurando-se analisar a respetiva ação antibacteriana relativamente aos óleos extraídos das plantas.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Óleos essenciais presentes nas plantas teste

Os óleos utilizados neste estudo são extraídos das folhas e ramos das plantas, através de arraste por corrente de vapor a nível industrial. São caracterizados por GC-MS e foram amavelmente cedidos pelo Professor Doutor Jesus Miguel L. Rodilla, do Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior. Obteve-se a caracterização química dos óleos, a sua densidade e realizaram-se as diluições de 1:2 e de 1:10 em DMSO para cada um.



**Figura 18** – Exemplo de um instrumento destinado para a realização de GC-MS [Consultado e adaptado em <https://www.ariangas.com/en/product/gas-chromatographic/>, a 5 de maio de 2019]

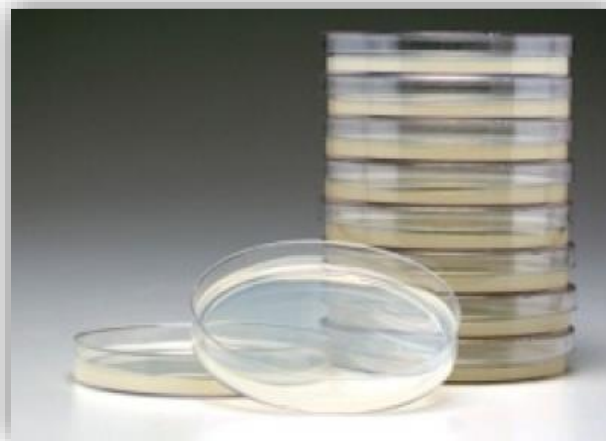
#### 3.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para a realização da prática laboratorial nesta experiência foram o Mueller-Hinton agar e broth preparados no laboratório BR – Análises Ambientais e Alimentares. Os meios utilizados foram os da OXOID como ilustrados na figura 19. Procedeu-se à preparação de placas de Petri, com o respetivo meio, com 4 mm de espessura, calculando-se, assim, cerca de 24 mL de meio por placa, volume ideal para inocular cada poço com 70  $\mu$ L de composto.





**Figura 19** – Meio de cultura Mueller-Hinton.



**Figura 20** – Exemplo de agar desidratado da Oxoid [Consultado e adaptado em <https://centerlabsp.com.br/produtos/microbiologia/mueller-hinton-agar-laborclin>, a 5 de maio de 2019].

### 3.3. Microrganismos teste

Para a realização prática do presente estudo os microrganismos teste foram reconstituídos no BR- Análises Ambientais e Alimentares, LDA, fornecidos pela American Type Culture Collection (ATCC), distribuídos por BAControl-5. Os microrganismos testados foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923/Lote 990105), a *Escherichia coli* (ATCC 25922/Lote 990422) e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145/Lote 990509), sendo, os mesmos, conservados a temperaturas entre os 2 °C e 8 °C. Desta forma, a utilização destas estirpes, facilita a padronização das culturas para os testes necessários.

Como foi anteriormente referido a escolha destes microrganismos obteve-se segundo determinados critérios. O *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), por ser uma bactéria representativa da superfície da pele humana, a *Escherichia coli* (ATCC 25923) por ser característica da flora intestinal e, por último, a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) dado ser uma bactéria ubíqua e representativa do meio ambiente.

A partir de cada estirpe ATCC foram realizadas inoculações, obtendo-se culturas puras de cada uma das estirpes a testar em placas de Mueller-Hinton que, por sua vez, incubaram durante 24 horas a 37°C e, de seguida, armazenadas a temperaturas entre 2 °C a 8 °C (designadas por Culturas mãe). As estirpes ATCC utilizadas foram armazenadas de forma devida.



**Figura 21**– Microrganismos testes utilizados na dissertação.

### 3.4. Densidade do inóculo

Sabe-se que a densidade do inóculo tem extrema interferência nos resultados dos ensaios. Desta forma, a quantidade do inóculo foi padronizada para cada estirpe com o intuito de garantir a reprodutibilidade analítica. Depois da recuperação das três estirpes liofilizadas da ATCC, cumprindo todas as instruções do fabricante para a obtenção das placas mães, a partir das mesmas, através do método de estrias, inocularam-se novas placas de Mueller-Hinton, uma para cada microrganismo. As novas placas foram designadas de placas de trabalho, a partir das quais foram retiradas colônias para realizar a padronização. As primeiras placas obtidas através das estirpes ATCC estão na origem de todos os ensaios que haja necessidade de repetir, assegurando-se, desta forma, o uso das estirpes ATCC.

As placas de trabalho foram incubadas durante 24 horas numa estufa a  $37 \pm 1$  °C tendo-se obtido várias colônias isoladas do microrganismo a testar que, depois, foram transferidas para soro fisiológico, a fim de ser atingida uma turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5 ( $\cong 10^8$  UFC/mL, num comprimento de onda de 550 nm,  $T \sim 74,9\%$ ,  $A \sim 0,125$ ).

As padronizações realizadas dos inóculos, na escala de McFarland, foram possíveis de medir através do aparelho DENSIMAT – Densitómetro com faixa entre 0,5 e 7,5 na escala de McFarland (Cód- 99234 BioMérieux). O aparelho funciona por meio da colocação do tubo com a suspensão no seu compartimento de leitura. Assim, com o apoio do aparelho referido, a densidade bacteriana é medida imediatamente e, esta, é diretamente proporcional à densidade da suspensão expressa em unidade de MacFarland, sendo o valor de 0,5 correspondente a  $10^8$  UFC/mL. Após a obtenção deste valor, procedeu-se a uma diluição da suspensão de  $10^8$  UFC/mL para  $\cong 10^6$  UFC/mL, uma vez que, tal valor, é o indicado para os testes realizados com bactérias. Foi sempre usada, como solução, soro fisiológico estéril (solução salina estéril a 0,90%). Ultimaram-se todos os testes na câmara de segurança biológica e sempre na presença da chama.



**Figura 22**– Densitômetro utilizado na dissertação com a turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5.

### **3.5. Métodos de difusão em placa com agar**

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método de difusão em meio sólido Mueller-Hinton pelo método de cavidades cilíndricas (poços), possuindo os mesmos uma altura de 4 mm e de diâmetro 5 mm e, o método do efeito de vapor. Ambos os métodos permitem, através da visualização dos resultados, uma ideia da potencialidade antimicrobiana dos compostos testados, visualizando os halos de inibição resultantes. Foram utilizados, como controlos positivos, dois antibióticos com uma concentração de 0,05 mg/mL, a Penicilina G (ação contra bactérias Gram positivas) e com uma concentração de 10 mg/mL e a Gentamicina, uma vez que, este, apresenta uma ação de largo espectro. Como controlo negativo foi utilizado o DMSO, solvente orgânico.

### **3.5.1. Difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas**

Após a preparação das placas, realizaram-se os poços através da utilização de utensílios adequados.

Através da suspensão inoculada e padronizada com o microrganismo a testar, procedeu-se ao espalhamento por toda a placa de agar de Mueller-Hinton, de modo uniforme, com um swab (zaragatoa) estéril (para a execução desta atividade teve-se o cuidado de eliminar o excesso de inóculo). Posto isto, a cultura foi deixada a repousar durante 15 minutos para que o meio de cultura absorvesse o inóculo.

De seguida, procedeu-se ao preenchimento dos poços com 70 µL dos compostos a testar, do controlo negativo e do controlo positivo. Deixou-se a repousar à temperatura ambiente por mais 15 minutos e as placas foram incubadas na estufa a uma temperatura de 37 °C durante 18 a 24 horas. Passado este período de incubação, todos os resultados foram observados e anotados. Note-se que todo o processo foi realizado sempre em condições de assepsia e esterilidade.

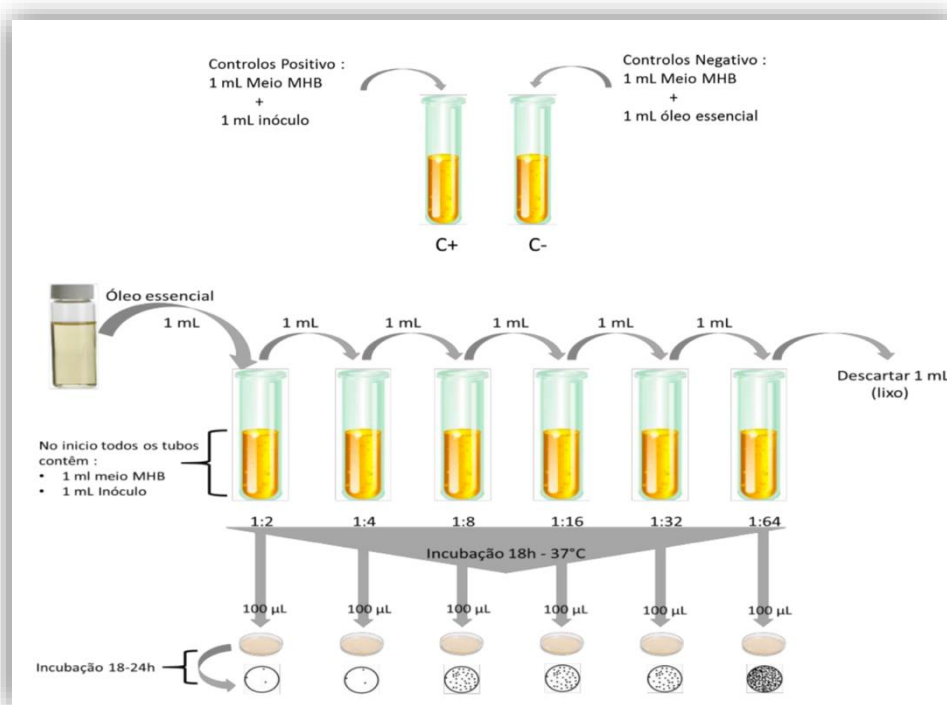
### **3.5.2. Difusão em agar por efeito de vapor**

Para a execução prática da difusão em placa por efeito de vapor, espalhou-se o microrganismo teste por toda a placa com Mueller-Hinton, com uma zaragatoa estéril. Esperou-se cerca de 15 minutos a fim de que o meio de cultura fosse capaz de reter e absorver o inóculo. Para que fosse possível realizar um teste comparativo com o método de difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas, adicionou-se o mesmo volume de composto a testar, nomeadamente 70 µL mas, neste caso, no centro da tampa da placa de Petri a uma distância de cerca de 1 cm do agar inoculado. Inverteu-se a placa e incubou-se esta a uma temperatura de 37 °C durante 18 a 24 horas. Após o fim do período de incubação, observou-se o efeito do composto no crescimento bacteriano. Todo o processo foi realizado em condições de esterilidade e assepsia.

### 3.5.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida por macrodiluição

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) foram realizadas pelo método de diluição em caldo, através da macrodiluição, exatamente como foi descrito em capítulos anteriores. A seguir está representado um exemplo idêntico ao que foi realizado, iniciando-se a sequência na diluição 1:4.

**Figura 23** – Exemplo de diluição em caldo utilizada no projeto. Contudo, no mesmo, começou-se na diluição 1:4 e adicionou-se o inóculo no final em cada tubo. [Figura consultada e adaptada da Tese do Mestre Rui Coca a 23 de Maio de 2019].



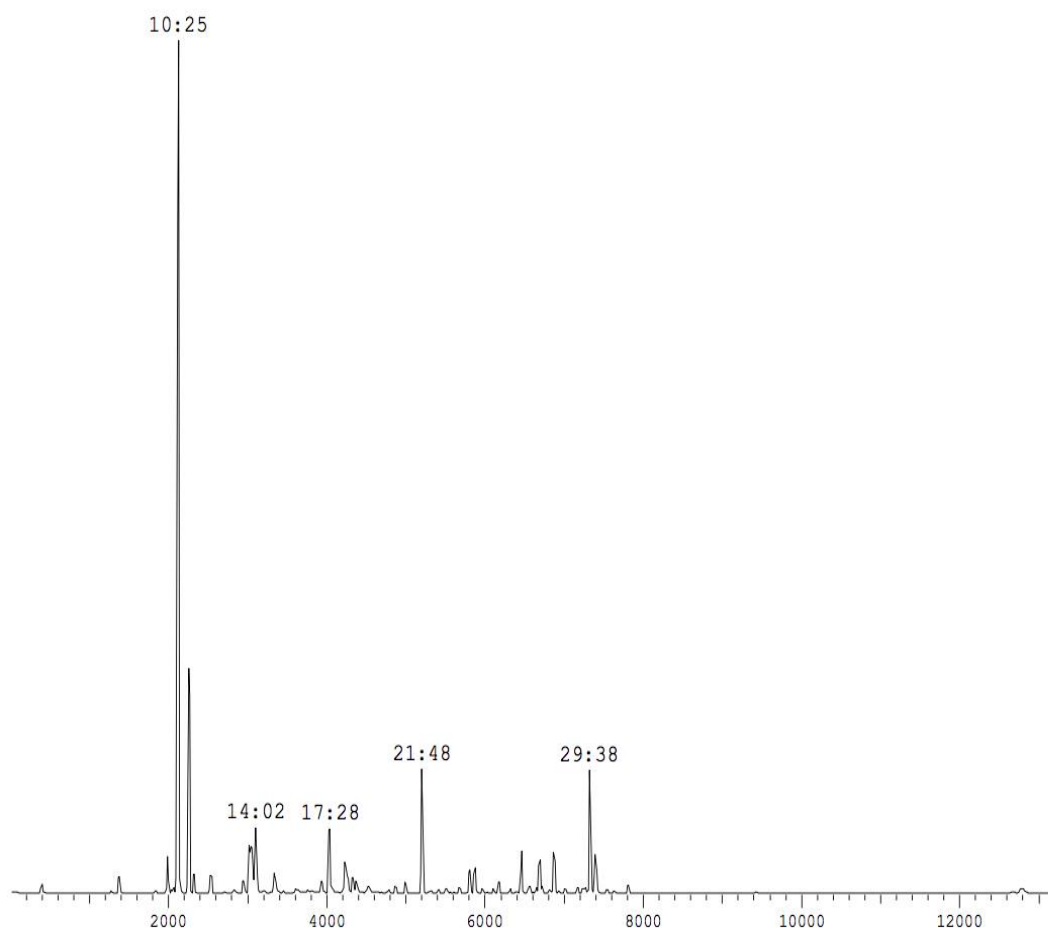
**Nota:** Note-se que para todos os ensaios foram efetuados testes de esterilidade das amostras onde se constatou que nunca houve crescimento bacteriano.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Constituição dos óleos essenciais das plantas em estudo

Depois da extração do óleo e análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GS-MS) obtiveram-se os cromatogramas (Figuras 24, 25, 26 e 27), permitindo a identificação dos principais componentes e respectivos tempos de retenção (Tabelas 1, 2, 3 e 4) presentes nas plantas *Cistus ladanifer*, *Líppia multiflora*, *Eucalyptus globulus* e *Mentha spicata*. Os dados e informação relativos à composição dos óleos, extração e seus componentes foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Jesus Miguel L. Rodilla, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

#### 4.1.1. *Cistus Ladanifer*



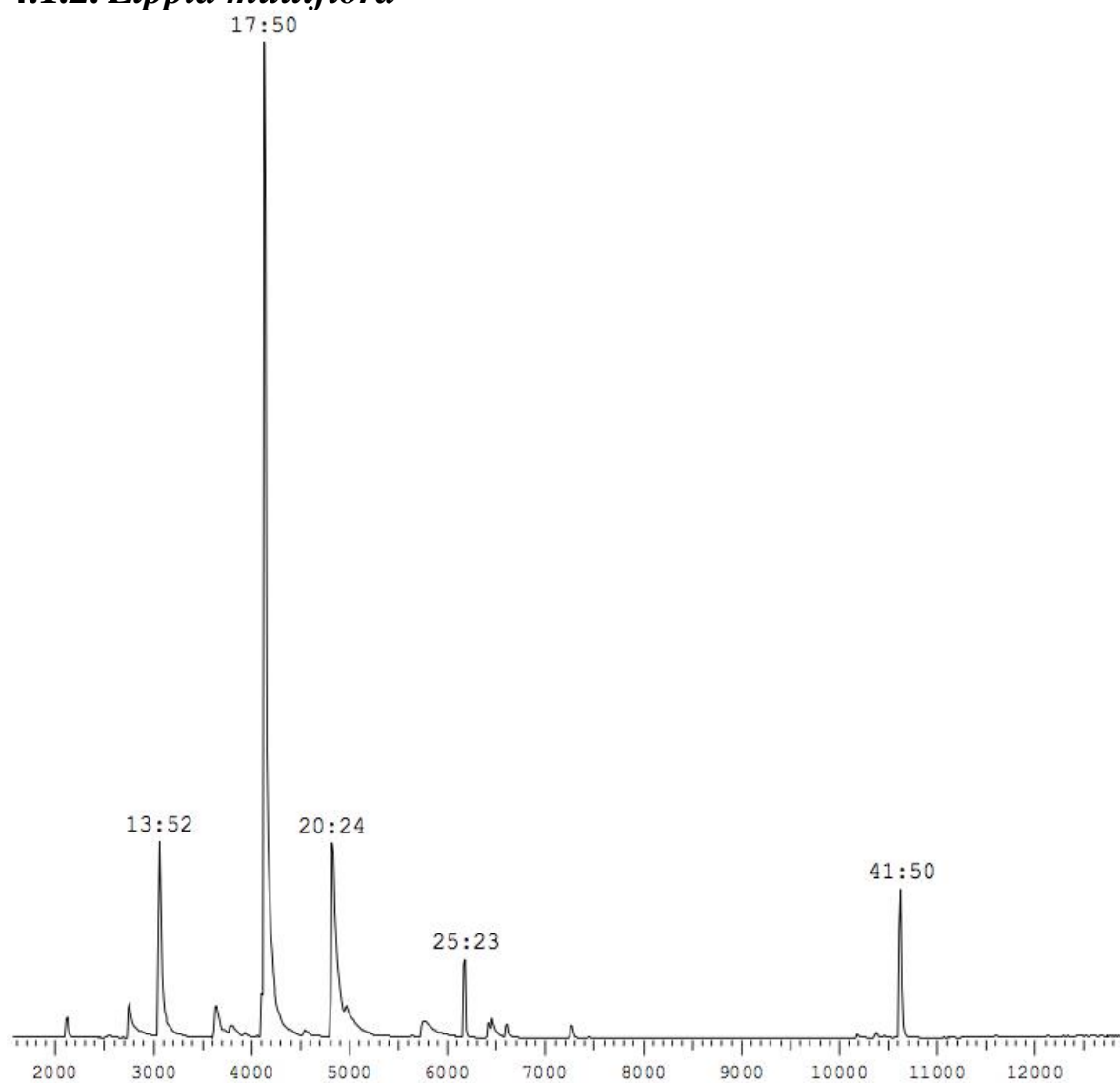
**Figura 24** – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de *Cistus Ladanifer*.

**Tabela 1** – Principais compostos presentes no óleo de *Cistus Ladanifer*.

Nº	Tempo de retenção	Componente	Ião molecular (M <sup>+</sup> )	%
1	4:02	isopropilfurano	110	0,31
2	7:38	2-etiliden-1,1-dimetilciclopentano	124	0,74
3	9:54	Triciclano	136	1,59
4	10:42	$\alpha$ -pinemo	136	46,37
5	10:54	Canfeno	136	9,46
6	11:08	Verbeneno	134	0,85
7	11:56	$\beta$ -pinemo	136	0,94
8	13:26	$\alpha$ -terpinemo	136	0,60
9	13:43	p-cinemo	134	2,35
10	13:50	Limoneno	136	2,87
11	14:02	2,2,6-trimetilciclohexanona	140	3,21
12	14:54	$\gamma$ -terpineno	136	1,35
13	17:06	$\alpha$ -canfolenal	152	0,71
14	17:28	Trans-pinocarveol	134	2,94
15	18:12	Pinocarvona	150	1,71
16	18:19	Borneol	154	0,88
17	18:33	Isopinocanfona	152	0,76
18	18:42	Terpinen-4-ol	154	0,74
19	19:16	Mirtenal	150	0,10
20	21:01	NI (Não identificado)	192	0,45
21	21:48	Acetato de bornilo	196	5,09
22	24:01	Ciclosativeno	204	1,35
23	25:23	$\beta$ -cariofileno	204	0,49
24	26:26	Aromadendreno	204	1,75
25	27:17	Iedeno	204	1,47
26	27:97	$\delta$ -cadineno	204	1,90
27	29:38	Viridiflorol	222	5,22
28	29:90	Iedol	222	2,47
29	31:26	$\delta$ -cadinol	222	0,35



#### 4.1.2. *Líppia multiflora*

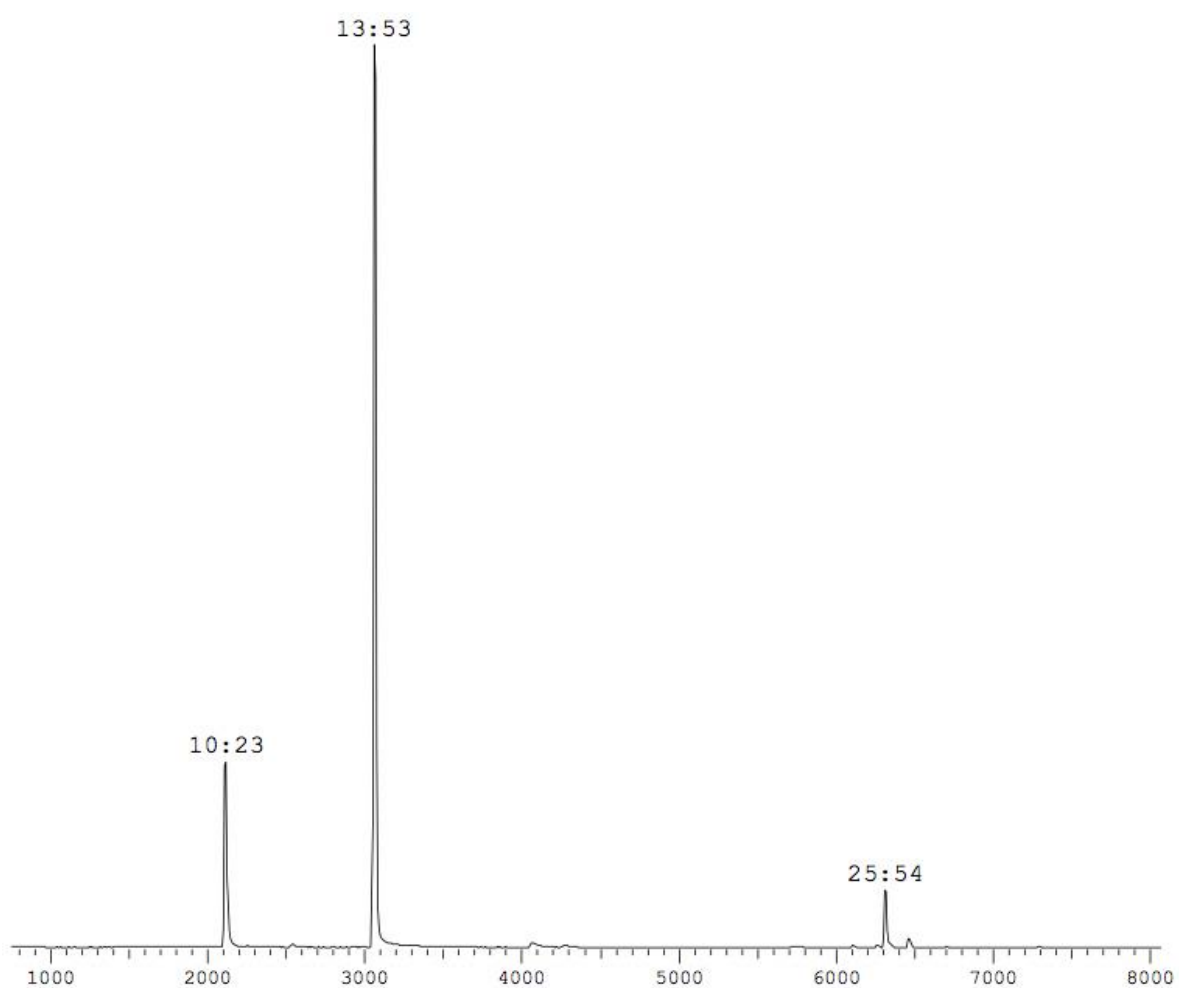


**Figura 25** – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de *Líppia multiflora*.

**Tabela 2** – Principais compostos presentes no óleo de *Lippia multiflora*.

Nº	Tempo de retenção	Componente	Ião molecular (M <sup>+</sup> )	%
1	10:24	β-pineno	136	0,40
2	12:44	Mirceno	136	2,44
3	13:52	Limoneno	136	11,16
4	16:02	Ipsenona	152	2,68
5	17:45	Tagetona	152	0,87
6	17:50	Vervenona	150	55,87
7	19:21	α-terpineol	150	0,70
8	20:24	Ocimenona	150	18,92
9	23:51	Piperitona	150	0,20
10	25:23	β-cariofileno	204	2,38
11	26:16	α-humuleno	204	0,30
12	26:24	β-farneseno	204	0,30
13	26:59	Germacreno D	204	0,30
14	29:26	Oxido de cariofileno	220	0,30
15	41:50	NI (Não identificado)	300	5,67

### 4.1.3. *Eucalyptus globulus*

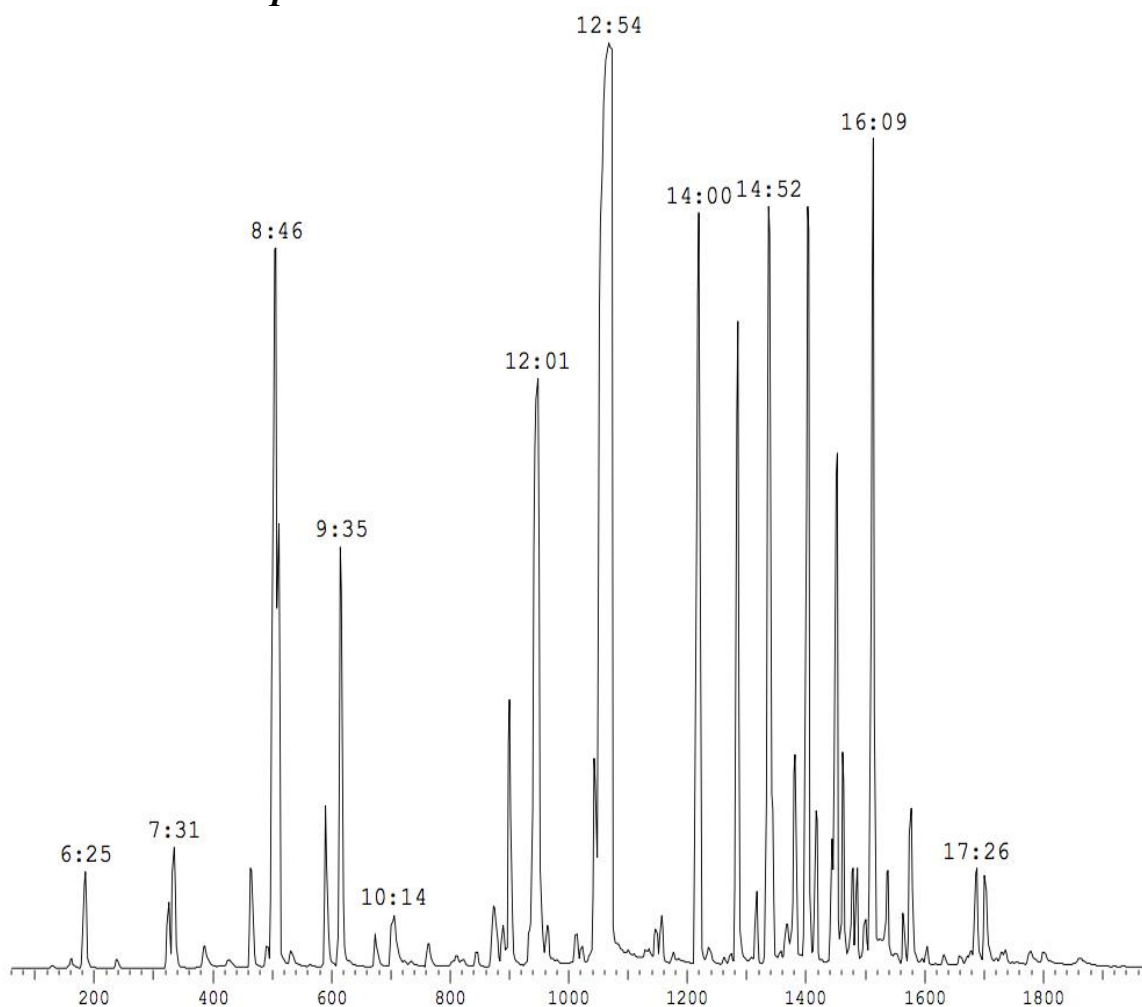


**Figura 26** – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*.

**Tabela 3** – Principais compostos presentes no óleo de *Eucalyptus globulus*.

Nº	Tempo de retenção	Composto	Ião Molecular (M <sup>+</sup> )	%
1	10:23	$\alpha$ -pineno	136	17,08
2	11:58	$\beta$ -pineno	136	0,10
3	13:53	1,8-cineol	154	77,11
4	17:36	Trans-pinocarveol	134	0,10
5	25:54	Aromadendreno	204	5,81
6	26:27	Allo-aromadendreno	204	0,10

#### 4.1.4. *Mentha spicata*



**Figura 27** – Cromatograma obtido por GC-MS dos óleos essenciais de *Mentha Spicata*.

**Tabela 4** – Principais compostos presentes no óleo de *Mentha spicata*.

Nº	Tempo de retenção	Composto	Ião Molecular (M+)	%
1	6:15	$\alpha$ -thujeno	136	0,02
2	6:25	$\alpha$ -pineno	136	0,70
3	6:49	Canfeno	136	0,10
4	7:27	Sabineno	136	0,45
5	7:31	$\beta$ -pineno	136	0,84
6	7:53	Mirceno	136	0,04
7	8:28	$\alpha$ -terpineno	136	0,71
8	8:40	p.cimeno	134	0,01
9	8:46	Limoneno	136	7,21
10	8:48	1,8-cineol	154	2,22
11	8:58	Trans-ocimeno	136	0,02
12	9:23	$\gamma$ -terpineno	136	1,13
13	9:35	Trans-sabinol	154	2,99
14	10:00	$\alpha$ -terpinoleno	136	0,28
15	10:12	Cis-sabinol	154	0,02
16	10:14	Linalool	154	0,66
17	10:39	1-terpineol	154	0,19
18	11:15	Mentona	154	0,01
19	11:28	Borneol	154	0,69
20	11:35	I-mentol	156	0,33
21	11:40	Terpinen-4-ol	154	1,86
22	11:55	$\alpha$ -terpineol	154	0,06
23	12:01	Dihidrovarveol	152	8,63
24	12:08	Dihidrocarvona	152	0,27
25	12:29	Carveol	152	0,22
26	12:43	Cis-carveol	152	1,36
27	12:54	Carvona	150	27,22
28	13:29	Acetato de mentilo	198	0,24
29	14:00	Acetato de dihidrocarveol	196	5,83
30	14:29	Acetato de carvilo	194	4,10
31	14:43	$\alpha$ -copaeno	204	0,41
32	14:52	$\beta$ -bourboneno	204	5,37
33	14:54	$\alpha$ -bourbonemo	204	0,94
34	15:05	NI (Não identificado)	204	0,37

**Tabela 4** – Principais compostos presentes no óleo de *Mentha spicata* (continuação).

<b>35</b>	15:09	$\beta$ -cariofileno	204	0,10
<b>36</b>	15:11	$\alpha$ -gurjuneno	204	1,40
<b>37</b>	15:21	$\beta$ -cariofileno	204	5,96
<b>38</b>	15:27	$\beta$ -cubebeno	204	0,83
<b>39</b>	15:39	Germacreno D	204	0,86
<b>40</b>	15:42	$\beta$ -farneseno	204	3,10
<b>41</b>	15:47	$\alpha$ -humuleno	204	1,19
<b>42</b>	15:54	Epi-biciclosesquifelandreno	204	0,69
<b>43</b>	15:57	Germacreno-isomer	204	0,50
<b>44</b>	16:03	$\gamma$ -muuroleno	204	0,31
<b>45</b>	16:09	Germacreno D	204	6,33
<b>46</b>	16:20	NI (Não identificado)	204	0,83
<b>47</b>	16:32	$\gamma$ -cadineno	204	0,26
<b>48</b>	16:37	$\delta$ -cadineno	204	1,06
<b>49</b>	16:49	$\alpha$ -muuroleno	204	0,06
<b>50</b>	17:26	Oxido de cariofileno	220	0,65
<b>51</b>	17:32	Viridiflorol	222	0,68

## 4.2. Atividade antimicrobiana das plantas em estudo

A avaliação da atividade antimicrobiana das plantas testadas foi realizada através de duas técnicas acima mencionadas (subcapítulo 1.9.2 e 1.9.3), a saber, a difusão por perfuração em poços e teste do efeito de vapor. Em ambas as técnicas, medem-se os halos de inibição de crescimento bacteriano. Na técnica de difusão por perfuração em poços, é medido o diâmetro do halo de inibição. Na técnica do efeito de vapor, a medição é feita de um modo semelhante, é medido o diâmetro aproximado resultante da dispersão do óleo evaporado. (Figura 28).



**Figura 28** – Técnica de difusão por perfuração em poços na esquerda e, na direita, técnica de efeito vapor.

Para a classificação da atividade antimicrobiana dos óleos das plantas e dos compostos isolados nas estirpes bacterianas selecionadas, designadamente, forte inibição, inibição moderada, fraca inibição ou sem inibição, foram comparados os halos de inibição das plantas e dos óleos essenciais com os halos resultantes da ação dos antibióticos usados como controlos positivos: Gentamicina e Penicilina G. Deste modo, tendo como base esta comparação, foi possível classificar os microrganismos de acordo com o descrito na tabela 5 (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 5** – Classificação da suscetibilidade dos microrganismos por comparação dos halos de inibição dos óleos das plantas e dos compostos isolados face aos halos resultantes dos controlos positivos

Suscetibilidade do microrganismo	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Sensíveis	$\geq$ Halo de inibição (C+) - 3 mm
Moderadamente sensíveis	$> 2 \text{ mm} < \text{Halo de inibição (C+) - 3 mm}$
Resistentes	$\leq 2 \text{ mm}$

C\*= Controlo positivo.

Para o cálculo das concentrações de cada óleo da planta e compostos isolados testados presentes em cada poço e, posteriormente, para o cálculo das CMI, procedeu-se da seguinte forma:

#### *Cistus Ladanifer*

-  $\rho$  (g/ml) do óleo de *Cistus Ladanifer* a 20 °C= 0.905

Tendo cada poço 70  $\mu$ l de óleo:

$$905 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \mu\text{l}$$

$$\chi \text{ mg} \text{ ----- } 70 \mu\text{l} \qquad \chi = 63.35 \text{ mg}$$

Deste modo, teremos 63.35 mg de óleo bruto por poço, 31.68 mg/poço na diluição de 1:2 e 6.34 mg/poço na diluição de 1:10.

#### *Lippia multiflora*

-  $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.907

- 63.49 mg / poço,

- 31.75 mg/poço na diluição de 1:2,

- 6.35 mg/poço na diluição de 1:10.



### **Eucalyptus globulus**

- $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.930
- 65.10 mg / poço,
- 32.55. mg/poço na diluição de 1:2,
- 6.51 mg/poço na diluição de 1:10.

### **Mentha spicata**

- $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.920
- 64.96 mg / poço,
- 32.48 mg/poço na diluição de 1:2,
- 6.50 mg/poço na diluição de 1:10.

### **$\beta$ -pineno**

- $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.872
- 61.04 mg / poço,
- 30.52 mg/poço na diluição de 1:2,
- 6.10 mg/poço na diluição de 1:10.

### **Cineol**

- $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.922
- 68.00 mg / poço,
- 34.00 mg/poço na diluição de 1:2,
- 6.80 mg/poço na diluição de 1:10.

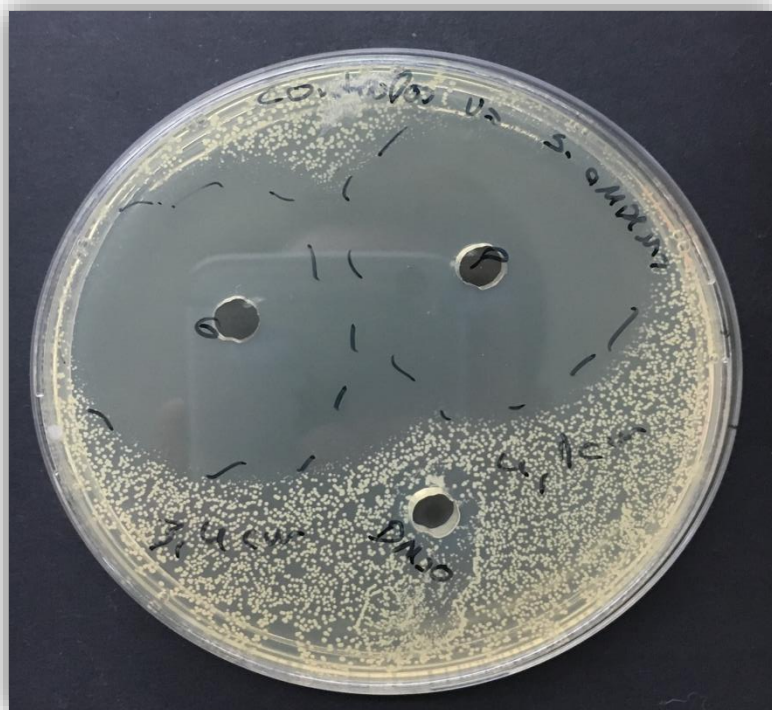
**S-(+)-carvona**

- $\rho$  (g/ml) do óleo de *Lippia multiflora* a 20 °C = 0.960
- 67.20 mg / poço,
- 33.60 mg/poço na diluição de 1:2,
- 6.72 mg/poço na diluição de 1:10.

#### 4.2.1. Halos de inibição pela técnica do poço

Como referenciado anteriormente, foram medidos os halos de inibição de crescimento bacteriano pela técnica de difusão por perfuração em poços, resultantes da ação antimicrobiana dos óleos das plantas e dos compostos isolados. Foram medidos, também, para termo de comparação, os halos inibitórios resultantes da ação dos controles positivos Penicilina G e Gentamicina e do controle negativo, o solvente orgânico DMSO, em três bactérias diferentes. Os resultados estão descritos nas tabelas seguintes.

Primeiramente, no conjunto das bactérias usadas neste estudo, observou-se que a Penicilina G tem efeito antimicrobiano contra a estirpe *S. aureus* (ATCC 25923). Este resultado é espetável, na medida em que este antibiótico atua em bactérias Gram positivas, não tendo sido observado qualquer efeito inibitório nas restantes bactérias. Verificou-se, também, que a Gentamicina, um antibiótico de largo espectro tem efeito antimicrobiano nas três estirpes bacterianas usadas. O solvente orgânico DMSO não apresentou qualquer efeito inibitório (tabela 6).



**Figura 29** – Técnica de difusão por perfuração em poços com os respectivos controles.

**Tabela 6** – Diâmetro dos halos inibitórios dos controles positivos e negativos pela técnica de difusão por perfuração em poços. Valores obtidos correspondentes à médias de triplicados.

Estirpes	Controles		
	Penicilina G (mm)	Gentamicina (mm)	DMSO (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	41	34	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	SI	40	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	SI	42	SI

SI: Ausência de halo de inibição.

De seguida, avaliou-se o efeito antimicrobiano do óleo de *Cistus ladanifer*. Constatou-se que, em todas as diluições efetuadas, o óleo apresenta atividade antimicrobiana contra as três diferentes bactérias. É de realçar o efeito que o óleo assume perante as estirpes *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), nas diferentes diluições, com valores muito semelhantes ao dos antibióticos que foram utilizados como controles. Este resultado evidencia que o óleo desta planta pode constituir uma alternativa ao uso da G ou da Gentamicina, contra as estirpes acima mencionadas. Não obstante, verificou-se que este óleo apresenta um efeito antimicrobiano menor que a Gentamicina na gama de concentrações testadas contra a estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145) (Tabela 7). Face a tais resultados, podemos considerar que as estirpes *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) são sensíveis ao efeito do óleo de *Cistus Ladanifer*, enquanto que para a estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145) se verifica uma certa resistência, comparando com os controles realizados (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 7** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Cistus ladanifer* pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	32	36	28
	2	35	37	20
	3	33	36	24
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	49	35	25
	2	44	33	31
	3	46	34	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	27	32	16
	2	20	31	13
	3	23	31	14

Do mesmo modo, foi avaliado o efeito antimicrobiano do óleo de *Líppia multiflora*. Constatou-se que, em todas as diluições efetuadas, o óleo apresenta certa atividade antimicrobiana contra a estirpe *S. aureus* (ATCC 25923). Porém, a inibição é bastante inferior à evidenciada pelos antibióticos Penicilina G e Gentamicina. Relativamente à estirpe *E. coli* (ATCC 25922), nas diferentes diluições, o óleo não apresenta qualquer atividade inibitória. Igualmente, para a estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145), o óleo apenas evidencia alguma atividade na diluição de 1:2, não sendo relevante na medida em que no óleo bruto e na diluição de 1:10 não se verifica qualquer efeito inibitório (Tabela 8). Posto isto, podemos constatar que as três bactérias são resistentes contra o óleo de *Líppia multiflora* (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 8** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Lippia multiflora* pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	18	17	12
	2	16	14	SI
	3	17	15	6
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI	12	SI
	2	SI	15	SI
	3	SI	13	SI

SI: Ausência de halo de inibição.

Seguidamente, avaliou-se o efeito antimicrobiano do óleo de *Eucalyptus globulus*. Verificou-se que, em todas as diluições efetuadas, o óleo apresenta determinada atividade antimicrobiana contra as três estirpes. No entanto, a inibição é bastante inferior à evidenciada pelos antibióticos Penicilina G e Gentamicina (Tabela 9). Deste modo, podemos considerar que todas as estirpes testadas, são moderadamente resistentes à ação inibitória do óleo de *Eucalyptus globulus* (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 9** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Eucalyptus globulus* pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	16	21	17
	2	13	19	19
	3	14	20	18
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	28	19	19
	2	26	21	15
	3	27	20	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	15	12	11
	2	16	17	9
	3	15	14	12

Por último, relativamente ao óleo da planta *Mentha spicata*, notou-se que, em todas as diluições efetuadas, com exceção da diluição 1:10 para a estirpe *S. aureus* (ATCC 25923). Porém óleo apresenta alguma atividade antimicrobiana contra os restantes microrganismos testados. Uma vez mais a inibição é bastante inferior à evidenciada pelos antibióticos Penicilina G e Gentamicina (Tabela 10). Deste modo, podemos considerar que todas as estirpes são resistentes à ação inibitória do óleo de *Mentha spicata* (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 10** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Mentha spicata* pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	12	10	SI
	2	11	8	SI
	3	11	9	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	21	19	17
	2	24	16	17
	3	22	17	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	16	12	13
	2	11	19	17
	3	13	15	15

SI: Ausência de halo de inibição.

Posto isto, decidi testar-se o efeito antimicrobiano de alguns compostos isolados, nomeadamente:  $\beta$ -pineno, Cineol e S-(+)-carvona. Isto porque, após a realização de GC-MS verificou-se a presença dos mesmos no óleo das plantas em estudo. Sendo assim, pretendeu-se avaliar de que modo é que estes compostos isolados atuavam sobre as bactérias testadas em comparação com o óleo das plantas (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

Inicialmente, avaliou-se o efeito antimicrobiano do composto isolado  $\beta$ -pineno. A primeira constatação recai sobre a atividade antimicrobiana inferior comparativamente aos controlos. Sabendo que este composto isolado está presente no óleo essencial de todas as plantas testadas, constituindo 0.94% do óleo de *Cistus ladanifer*, 0.4% do óleo de *Lippia multiflora*, 0.1% do óleo de *Eucalyptus globulus* e 0.84% do óleo de *Mentha spicata*, deparamos que, o composto isolado, tem algum efeito inibitório nas estirpes testadas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). No entanto, apenas nas duas últimas diluições efetuadas apresenta atividade contra a estirpe testada de *P. aeruginosa* (ATCC 10145). Dos óleos das plantas testados, apenas o de *Cistus ladanifer* e *Lippia multiflora*



possuem  $\beta$ -pineno. Relativamente ao primeiro, o composto isolado possui um efeito inibitório inferior ao do óleo da planta, o que leva a crer que poderá não ser este o maior responsável pela atividade antimicrobiana, tendo-se, no entanto, em consideração o facto de poder existir sinergismo com outros compostos presentes no óleo de *Cistus ladanifer*. Quanto ao óleo de *Lippia multiflora* observou-se que, embora em baixa concentração, a ação inibitória do composto isolado é semelhante à do óleo da planta, demonstrando-se que, este composto, poderá ser o maior responsável pela atividade antimicrobiana do óleo da planta nas bactérias alvo (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 11** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado  $\beta$ -pineno pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	12	14	SI
	2	17	11	SI
	3	14	12	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	13	16	9
	2	17	18	13
	3	15	17	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI	14	12
	2	SI	17	15
	3	SI	15	13

SI: Ausência de halo de inibição.

De seguida, avaliou-se o efeito antimicrobiano do composto isolado Cineol, tendo-se constatado uma atividade antimicrobiana inferior à dos controlos. Sabendo que este composto está presente no óleo de *Eucalyptus globulus* (77.11%) e no óleo de *Mentha spicata* (2.22%), verificou-se que o composto isolado tem algum efeito inibitório nas

estirpes testadas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), com exceção da última diluição realizada (1:10). No entanto, apenas nas diluições efetuadas apresenta atividade contra a estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145). Dos óleos das plantas testados, apenas o de *Eucalyptus globulus* e o de *Mentha spicata* possuem Cineol. Relativamente ao primeiro, o composto isolado possui um efeito inibitório inferior ao do óleo da planta. No entanto, como foi descrito, o óleo de *Eucalyptus globulus* possui, para além de Cineol, também  $\beta$ -pineno, embora em muito menor concentração. Como relatado anteriormente, o composto isolado de  $\beta$ -pineno detém, igualmente, alguma ação inibitória, o que leva a constatar que no óleo da planta de *Eucalyptus globulus* estes dois compostos (Cineol e  $\beta$ -pineno) possam estar a atuar sinergicamente no que concerne à atividade antimicrobiana (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 12** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado Cineol pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	10	13	SI
	2	9	10	SI
	3	9	11	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	19	11	SI
	2	14	13	SI
	3	16	13	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI	9	11
	2	SI	13	18
	3	SI	11	14

SI: Ausência de halo de inibição.

Por último, avaliou-se o efeito antimicrobiano do composto isolado S-(+)-carvona, tendo-se verificado, mais uma vez, atividade antimicrobiana inferior à dos controlos para as estirpes de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Todavia,

surpreendentemente, o composto isolado apresenta uma atividade antimicrobiana semelhante à ação da Gentamicina contra a estirpe de *P. aeruginosa* (ATCC 10145). Verificou-se ainda que, o composto isolado, tem algum efeito inibitório para as estirpes de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), com exceção da última diluição realizada (1:10). No caso da estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145) testada apresentam-se valores de inibição muito superiores aos evidenciados pelo óleo de *Mentha spicata*, a única planta que possui S-(+)-carvona. Este resultado leva-nos a crer que, embora o óleo de *Mentha spicata* possua na sua composição 0.84% de  $\beta$ -pineno, 2.22% de Cineol e 27.22% de S-(+)-carvona, os compostos possam ter atividade antagônica, na medida em que, no seu conjunto, a atividade antimicrobiana do óleo de *Mentha spicata* é muito inferior aquela evidenciada pelo composto isolado S-(+)-carvona (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 13** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado S-(+)-carvona pela técnica de difusão por perfuração em poços.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)			
	Triplicados	Bruto	Diluição 1:2	Diluição 1:10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	17	16	SI
	2	18	15	SI
	3	17	15	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	19	22	SI
	2	17	25	SI
	3	18	23	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	40	20	11
	2	32	23	12
	3	36	21	11

SI: Ausência de halo de inibição.

#### 4.2.2. Halos de inibição pela técnica do efeito de vapor

Seguidamente, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos das plantas anteriormente mencionadas e dos compostos isolados de três componentes presentes nestas plantas pela técnica do efeito de vapor. Como descrito anteriormente, a medição dos halos de inibição é feita a partir do diâmetro aproximado resultante da dispersão do óleo evaporado e a maior distância definida pelas extremidades do halo inibitório. Os resultados obtidos encontram-se descritos nas tabelas seguintes.

**Tabela 14** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Cistus ladanifer* pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	40
	2	37
	3	38
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	39
	2	35
	3	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	39
	2	33
	3	36

**Tabela 15** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Lippia multiflora* pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	20
	2	23
	3	21
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	SI
	2	SI
	3	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI
	2	SI
	3	SI

SI: Ausência de halo de inibição.

**Tabela 16** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Eucalyptus globulus* pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	15
	2	16
	3	15
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	22
	2	27
	3	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	10
	2	16
	3	13

**Tabela 17** – Diâmetro dos halos inibitórios do óleo de *Mentha spicata* pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	14
	2	15
	3	13
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	29
	2	31
	3	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	13
	2	12
	3	16

Neste método foi testada a volatilidade do óleo das quatro plantas em estudo. Concordantemente com os resultados obtidos pela técnica de difusão por perfuração de poços, observou-se atividade antimicrobiana por parte dos óleos das plantas *Cistus ladanifer*, *Eucalyptus globulus* e *Mentha spicata* nas três bactérias alvo. Igualmente, o óleo da planta *Líppia multiflora* apenas apresenta atividade antimicrobiana sobre a estirpe testada de *S. aureus* (ATCC 25923), como se observou pela técnica de difusão por perfuração de poços (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).

**Tabela 18** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado  $\beta$ -pineno pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	SI
	2	SI
	3	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	45
	2	46
	3	46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI
	2	SI
	3	SI

SI: Ausência de halo de inibição.

**Tabela 19** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado Cineol pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	SI
	2	SI
	3	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	31
	2	27
	3	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	24
	2	21
	3	22

SI: Ausência de halo de inibição.

**Tabela 20** – Diâmetro dos halos inibitórios do composto isolado S-(+)-carvona pela técnica do efeito de vapor.

Estirpes	Halo de inibição do óleo (mm)	
	Triplicados	Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	1	SI
	2	SI
	3	SI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1	25
	2	24
	3	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	1	SI
	2	SI
	3	SI

SI: Ausência de halo de inibição.

Relativamente aos compostos isolados, testados pela técnica do efeito de vapor, observa-se atividade antimicrobiana dos compostos  $\beta$ -pineno e S-(+)-carvona apenas em *E. coli* e atividade antimicrobiana de Cineol em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Não é possível efetuar uma relação direta entre a melhor atividade antimicrobiana dentre os testes efetuados, uma vez que, na técnica de perfuração por poços, os compostos difundem-se enquanto que na técnica de efeito vapor os compostos que atuam são aqueles que volatizam a uma temperatura de 37 °C (Ostrosky E. A. *et al.*, 2008).



### 4.2.3. CMI e CMB – Método de macrodiluição

A determinação dos valores de CMI e CMB foi feita de acordo com o descrito anteriormente (1.9.4) recorrendo ao método de diluição em caldo pela técnica de macrodiluição. Para a determinação da CMI é considerada a maior diluição que não apresenta turvação visível a olho nu. Relativamente à CMB, é sempre considerada menor ou igual à CMI, na medida em que representa o efeito bactericida no crescimento em meio de cultura sólido, correspondendo à inibição de no mínimo 99.9% do inóculo original. Nestes ensaios usou-se um inóculo de  $10^6$  UFC/ml, considerando-se, assim, como CMB, as placas que apresentam crescimento bacteriano  $\leq 0.1\%$  do inóculo original, ou seja, correspondente a  $\leq 50$  UFC/placa, utilizando o método de espalhamento, com o volume de inóculo 0,1mL e considerando o tubo inicial com 2mL.

Foram preparadas diluições sequenciais em duplicado, começando pela diluição do óleo bruto 1:2 em DMSO e seguidamente de 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, como descrito nas tabelas seguintes. Após 18h de incubação a 37°C, observaram-se os tubos e adicionou-se 1 ml de resazurina. Ao fim de 30 minutos realizaram-se as leituras. Os resultados encontram-se descritos nas tabelas seguintes, que incluem os valores de CMI, CMB (com a contagem de colónias) e a cor correspondente à transformação da resazurina em resofurina, traduzindo o crescimento bacteriano. Os resultados estão separados pelo tipo de óleo utilizado e número do ensaio.

**Tabela 21** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Cistus ladanifer* – 1º ensaio.

<i>Cistus ladanifer</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.25	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.13	A	< 1	R	> 100	A	< 1
<b>1:16</b>	56.56	A	< 1	R	> 100	A	< 1
<b>1:32</b>	28.28	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.14	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 22** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Cistus ladanifer* – 2º ensaio.

<i>Cistus ladanifer</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.25	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.13	A	< 1	R	> 100	A	< 1
<b>1:16</b>	56.56	A	< 1	R	> 100	A	< 1
<b>1:32</b>	28.28	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.14	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 23** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Eucalyptus globulus* – 1º ensaio.

<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	232.50	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	116.25	R	> 100	R	> 100	A	< 1
<b>1:16</b>	58.13	R	> 100	R	> 100	A	< 1
<b>1:32</b>	29.06	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.53	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	>100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 24** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Eucalyptus globulus* – 2º ensaio.

<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	232.50	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	116.25	R	> 100	R	> 100	A	< 1
<b>1:16</b>	58.13	R	> 100	R	> 100	A	< 1
<b>1:32</b>	29.06	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.53	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	>100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 25** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Lippia multiflora* – 1º ensaio.

<i>Lippia multiflora</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.75	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.38	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	56.69	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.34	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.17	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	>100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 26** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Lippia multiflora* – 2º ensaio.

<i>Lippia multiflora</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.75	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.38	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	56.69	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.34	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	14.17	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	>100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 27** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Mentha spicata* – 1<sup>o</sup> ensaio.

<i>Mentha spicata</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.75	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.38	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	56.69	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.34	R	> 100	A	< 1	R	> 100
<b>1:64</b>	14.17	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 28** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o óleo de *Mentha spicata* – 2<sup>o</sup> ensaio.

<i>Mentha spicata</i>		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	226.75	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	113.38	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	56.69	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.34	R	> 100	A	< 1	R	> 100
<b>1:64</b>	14.17	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 29** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência  $\beta$ -pineno – 1º ensaio.

$\beta$ -pineno		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	218.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	109.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	54.50	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	27.25	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	16.63	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 30** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência  $\beta$ -pineno – 2º ensaio.

$\beta$ -pineno		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	218.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	109.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	54.50	R	> 100	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	27.25	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	16.63	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 31** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência Cineol – 1º ensaio.

Cineol		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	230.50	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	115.25	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	57.63	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.81	R	> 100	R	>100	A	< 1
<b>1:64</b>	14.41	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	> 100	R	> 100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 32** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência Cineol – 2º ensaio.

Cineol		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	230.50	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	115.25	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:16</b>	57.63	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:32</b>	28.81	R	> 100	R	>100	A	< 1
<b>1:64</b>	14.41	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	> 100	R	> 100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 33** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência S-(+)-carvona – 1<sup>o</sup> ensaio.

S-(+)-carvona		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	240.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	120.00	A	< 1	A	< 1	R	> 100
<b>1:16</b>	60.00	A	< 1	A	< 1	R	> 100
<b>1:32</b>	30.00	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	15.00	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;

**Tabela 34** – Resultados CMI e CMB para as três estirpes estudadas com o composto de referência S-(+)-carvona – 2<sup>o</sup> ensaio.

S-(+)-carvona		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	
Diluições (mg/ml)		CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)	CMI (cor)	CMB (UFC/placa)
<b>1:4</b>	240.00	A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>1:8</b>	120.00	A	< 1	A	< 1	R	> 100
<b>1:16</b>	60.00	A	< 1	A	< 1	R	> 100
<b>1:32</b>	30.00	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>1:64</b>	15.00	R	> 100	R	>100	R	> 100
<b>C-</b>		A	< 1	A	< 1	A	< 1
<b>C+</b>		R	> 100	R	>100	R	>100

A – cor azul, após resazurina; R – cor rosa, após resazurina;

C+ = controlo positivo; C- = Controlo negativo;



### 4.3. Tratamento estatístico

No presente estudo, a análise estatística visa comparar os resultados obtidos entre os diferentes óleos de plantas e os compostos isolados para as três estirpes bacterianas testadas. O número de ensaios por estirpe (3), levou a que não fosse realizado qualquer teste estatístico. Deste modo, uniformizaram-se os resultados, estando descritas as médias e desvios padrão para as amostras presentes neste estudo, nos diferentes ensaios.

#### Difusão por perfuração de cavidades em agar

**Tabela 35** – Resultados obtidos dos halos de inibição dos óleos das plantas no ensaio de difusão por perfuração de cavidades em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.

		Halo de inibição do óleo (mm)					
		Bruto (1:1)		1:2		1:10	
	Estirpes	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<i>Cistus ladanifer</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	33,33	±1,53	36,33	±0,58	24,00	±4,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	46,33	±2,52	34,00	±1,00	28,00	±3,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	23,33	±3,51	31,33	±0,58	14,33	±1,53
Concentração (mg/70µl)		63,35		31,68		6,34	
<i>Lippia multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	17,00	±1,00	15,33	±1,53	6,00	±6,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00	13,33	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µl)		63,49		31,75		6,35	
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	14,33	±1,53	20,00	±1,00	18,00	±1,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	27,00	±1,00	20,00	±1,00	17,33	±2,08
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	15,33	±0,58	14,33	±2,52	10,67	±1,53
Concentração (mg/70µl)		65,10		32,55		6,51	
<i>Mentha spicata</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	11,33	±0,58	9,00	±1,00	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	22,33	±1,53	17,33	±1,53	16,00	±1,73
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	13,33	±2,52	15,33	±3,51	15,00	±2,00
Concentração (mg/70µl)		64,96		32,48		6,50	

**Tabela 36** – Resultados obtidos dos halos de inibição dos compostos isolados no ensaio de difusão por perfuração de cavidades em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.

		Halo de inibição do óleo (mm)					
		Bruto (1:1)		1:2		1:10	
	Estirpes	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b><i>β-Pinemo</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	14,33	±2,52	12,33	±1,53	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	15,00	±2,00	17,00	±1,00	11,00	±2,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00	15,33	±1,53	13,33	±1,53
Concentração (mg/70µl)		61,04		30,52		6,10	
<b><i>Cineol</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	9,33	±0,58	11,33	±1,53	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16,33	±2,52	12,00	±1,00	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00	11,00	±2,00	11,00	±3,51
Concentração (mg/70µl)		68,00		34,00		6,80	
<b><i>S-(+)-carvona</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	17,33	±0,58	15,33	±0,58	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	18,00	±1,00	23,33	±1,53	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	36,00	±4,00	21,33	±1,53	11,33	±0,58
Concentração (mg/70µl)		67,2		33,60		6,72	

## Efeito vapor em placa de agar

**Tabela 37** – Resultados obtidos dos halos de inibição dos óleos das plantas no ensaio do efeito de vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.

		Óleo Bruto (1:1)	
		Halo de inibição (mm)	
	Estirpes	Média	Desvio Padrão
<i>Cistus ladanifer</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	38,33	±1,53
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	37,00	±2,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	36,00	±3,00
Concentração (mg/70µl)		63,35	
<i>Lippia multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	21,33	±1,53
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00
Concentração (mg/70µl)		63,49	
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	15,33	±0,58
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	25,67	±3,21
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	13,00	±3,00
Concentração (mg/70µl)		65,10	
<i>Mentha spicata</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	14,00	±1,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	30,00	±1,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	13,67	±2,08
Concentração (mg/70µl)		64,96	

**Tabela 38** – Resultados obtidos dos halos de inibição dos compostos isolados no ensaio do efeito de vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados realizados para cada estirpe bacteriana.

		<b>Óleo Bruto (1:1)</b>	
		Halo de inibição (mm)	
	<b>Estirpes</b>	Média	Desvio Padrão
<b><i>β-pineno</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	45,67	±0,58
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00
Concentração (mg/70μl)		61,04	
<b><i>Cineol</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	29,00	±2,00
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	22,33	±1,53
Concentração (mg/70μl)		68,04	
<b><i>S-(+)- Carvona</i></b>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0,00	0,00
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	24,33	±0,58
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0,00	0,00
Concentração (mg/70μl)		67,20	

## 5. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo estudar as capacidades antimicrobianas de óleos de quatro plantas, nomeadamente *Cistus ladanifer*, *Lippia multiflora*, *Eucalyptus globulus* e *Mentha spicata*. Para além disso, pretendeu-se testar a atividade antimicrobiana de compostos isolados presentes nas mesmas, designadamente  $\beta$ -pineno, Cineol e S-(+)-carvona. Todos estes testes foram realizados contra as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) já que se sabe que, as mesmas, podem levar ao desenvolvimento de patologias no ser humano. Como acima referido, para averiguar a capacidade antimicrobiana de todos os óleos testados foram realizados três ensaios diferentes: difusão por perfuração em poços, teste do efeito de vapor e, ainda, o método da macrodiluição.

Pela técnica de difusão por perfuração de poços, foi possível observar que o controlo positivo Penicilina G tem efeito antimicrobiano contra a estirpe Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923) e que o antibiótico Gentamicina apresentou efeito contra as três estirpes testadas. Por outro lado, o solvente orgânico DMSO usado como controlo negativo não apresentou qualquer efeito inibitório. Estes resultados eram espectáveis devido ao descrito na bibliografia e serviram como termo de comparação com os resultados obtidos para os óleos submetidos a testes.

Após a análise dos resultados pela técnica de difusão por perfuração em poços em agar, relativamente à estirpe *S. aureus* (ATCC 25923), o óleo da planta *Cistus ladanifer* é aquele que apresenta uma maior atividade antimicrobiana, na concentração de 31.68 mg/poço em comparação com as restantes plantas testadas. Analisando ainda a atividade antimicrobiana contra esta estirpe, o composto isolado que evidenciou melhores resultados foi S-(+)-carvona na concentração de 67.20 mg/poço. Pela técnica de efeito vapor em placa de agar, os resultados são concordantes, sendo o óleo de *Cistus ladanifer* o que demonstra melhor atividade. Quanto à atividade antimicrobiana dos compostos isolados testados pela mesma técnica, nenhum apresentou atividade contra *S. aureus* (ATCC 25923). Na técnica de macrodiluição em caldo, verificou-se que o óleo da planta *Cistus ladanifer* e o composto isolado Cineol foram aqueles que apresentaram uma menor concentração para inibir o crescimento bacteriano de *S. aureus* (ATCC 25923) (56.56 e 57.63 mg/ml,

respetivamente). Estes resultados evidenciam que, o óleo de *Cistus ladanifer* poderá ser um substituto natural ao uso dos antibióticos testados contra esta bactéria.

Do mesmo modo, relativamente à estirpe *E. coli* (ATCC 25922), pela técnica de difusão por perfuração em poços em agar, o óleo da planta *Cistus ladanifer* é, novamente, aquele que apresenta uma maior atividade antimicrobiana, na concentração de 63.35 mg/poço. Mais se observa que o composto isolado que evidenciou melhores resultados foi S-(+)-carvona na concentração de 33.60 mg/poço. Pela técnica de efeito vapor em placa de agar, os resultados são idênticos, sendo o óleo de *Cistus ladanifer* o que demonstra melhor atividade antimicrobiana. Relativamente à atividade antimicrobiana dos compostos isolados o  $\beta$ -pineno foi o que evidenciou o resultado mais significativo contra a estirpe *E. coli* (ATCC 25922). Na técnica de macrodiluição em caldo, verificou-se que o óleo da planta *Mentha spicata* e o composto isolado  $\beta$ -pineno foram aqueles que apresentaram uma menor concentração suficiente para inibir o crescimento da estirpe de *E. coli* (ATCC 25922) (28.34 e 54.50 mg/ml, respetivamente). Estes resultados revelam que o óleo de *Mentha spicata* poderá constituir um substituto natural ao uso da Gentamicina contra esta bactéria, uma vez que o óleo de *Cistus ladanifer* apesar de apresentar bons resultados no que diz respeito às duas técnicas em placa, revela um valor concentração mínima inibitória muito elevada (226.25 mg/ml).

Por último, relativamente à estirpe de *P. aeruginosa* (ATCC 10145), pela técnica de perfuração de cavidades em agar, o óleo da planta *Cistus ladanifer* é, novamente, aquele que apresenta uma maior atividade antimicrobiana, na concentração de 31.68 mg/poço. Observou-se, também, que o composto isolado que evidenciou melhores resultados para esta estirpe foi S-(+)-carvona na concentração de 67.20 mg/poço. Pela técnica de efeito vapor em placa de agar, uma vez mais o óleo de *Cistus ladanifer* demonstra uma notável atividade antimicrobiana. Relativamente à atividade antimicrobiana dos compostos isolados o Cineol foi o único que apresentou atividade antimicrobiana contra a estirpe *P. aeruginosa* (ATCC 10145). Na técnica de diluição em caldo, verificou-se que todos os óleos das plantas testadas apresentaram um valor muito semelhante de concentração mínima inibitória, a rondar os 55 mg/ml. No que diz respeito aos compostos isolados, o Cineol foi aquele que demonstrou uma menor concentração para inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* (ATCC 10145) (28.81 mg/ml). Apesar de todos os óleos das

plantas testados apresentarem um bom valor de CMI, o óleo de *Lippia multiflora* não revela qualquer atividade nas técnicas por placa. Deste modo, os três restantes podem constituir uma boa alternativa ao uso da Gentamicina contra a *P. aeruginosa* (ATCC 10145).

De um modo geral, os resultados conseguidos neste estudo evidenciam que os óleos extraídos de plantas, principalmente o óleo de *Cistus ladanifer*, bem como os compostos isolados presentes nestes óleos constituem excelentes alternativas naturais ao uso de antibióticos no tratamento de diversas patologias causadas por bactérias oportunistas. Contudo, é necessário realçar novamente que estivemos a comparar antibióticos hidrofílicos com substâncias hidrofóbicas, complicando-se assim a difusão das mesmas nas placas de agar como referido anteriormente.

## 6. Perspetivas futuras

- Avaliar possíveis metodologias que não tornem a interação hidrofóbica na difusão do óleo no meio de cultura um problema.
- Analisar a interação óleo-emulsionante.
- Estudar mais óleos essenciais.
- Realizar um maior número de ensaios a fim de que estatisticamente se possam avaliar as variâncias dos resultados.
- Estudar mais compostos isolados presentes nas plantas, não apenas os majoritários.
- Tentar perceber quais os compostos dos óleos que emulsionam à temperatura de 37 °C.
- Avaliar mais combinações de compostos para que se perceba se atuam de forma antagónica ou sinérgica.



## 7. Bibliografia

Aldoghaim, F. S., Flematti, G. R. and Hammer, K. A. (2018) 'Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian Eucalyptus Essential Oils', pp. 1–11. doi: 10.3390/microorganisms6040122.

Asekun O, Grierson D, Afolayan A. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. Food Chem. 2007;101(3):995–8.

Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Rev Bras Farmacogn 18: 90-97.

Baker, C. N., Hollis, D. G. and Thornsberry, C. (1985) 'Antimicrobial Susceptibility Testing of *Francisella tularensis* with a Modified Mueller-Hinton Broth', 22(2), pp. 212–215.

Bakkali F, et al. Biological effects of essential oils—a review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446–75.

Bardaweel, S. K. *et al.* (2018) 'Chemical composition , antioxidant , antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L . ( Lamiaceae ) from Algerian Saharan atlas'. BMC Complementary and Alternative Medicine, pp. 1–7.

Barry AL, Thornsberry C 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125.

Baydar H, Sađdiç O, Özkan G, Karadođan T 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control 15:169-172.

Belenky, P. *et al.* (2015) ‘Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage Article Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage’, *CellReports*. Elsevier Ltd, 13(5), pp. 968–980. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.059.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Clarke, N. D.(2002). *Biochemistry*. U.S.A, Fifth Edition, W. H. Freeman and Company. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=aminoglycosides%2Caction&rid=stryer%2Etable%2E4207>>. [Consultado em 2019/03/23].

Bryskier, A. (2005). *Antimicrobial Agents: Antibacterial and Antifungals*. ASM Press.

Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, Romagnoli C, Sacchetti G 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingoessential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. *Food Chem* 85: 415-421.

Chandrasekaran, M. and Venkatesalu, V. (2004) ‘Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds’, 91(November 2003), pp. 105–108. doi: 10.1016/j.jep.2003.12.012.

Celenk S, et al. A palynological study of the genus *Mentha* L.(Lamiaceae). *Bot J Linn Soc*. 2008;157(1):141–54.

Coppen, J.J.W.; Hone, G.A. *Eucalyptus Oils: A Review of Production and Markets*; Natural Resources Institute: Kent, UK, 1992.

D. V. Lakusic, M. S. Ristic, V. N. Slavkovska, J. B. Sinzar- Sekulic, B. S. Lakusic, ‘Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary

(*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula', *Chem. Biodiversity* 2012, 9, 1286 – 1302.

Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* 2007;21(4):308–23.

Etou-Ossibi, A.W. Nzonzi, J., Mombouli, J.V., Nsondé-Ntandou, G.E., Ouamba, J.M. and Abena, A.A. (2005). Screening chimique et effets de l'extrait aqueux du *Lippia multiflora* Moldenke sur le cœur isolé du crapaud. *Phytotherapy*. 5: 193-199.

Gilles, M.; Zhao, J.; An, M.; Agboola, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem.* 2010, 119, 731–737.

González-Burgos, E.; Liaudanskas, M.; Viškelis, J.; Žvikas, V.; Janulis, V.; Gómez-Serranillos, M. Antioxidant activity, neuroprotective properties and bioactive constituents analysis of varying polarity extracts from *Eucalyptus globulus* leaves. *J. Food Drug Anal.* 2018, 26, 1293–1302.

Gorwitz, R. J. *et al.* (2008) 'Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004', *The Journal of Infectious Diseases*, 197(9), pp. 1226–1234. doi: 10.1086/533494.

Güllüce, M., Ö, H. and Sahin, F. (2003) 'Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L.', 85, pp. 231–235. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00006-0.

Henri, I., Bassolé, N. and Juliani, H. R. (2012) 'Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties', pp. 3989–4006. doi: 10.3390/molecules17043989.

Homma, T. *et al.* (2016) 'Dual Targeting of Cell Wall Precursors by Teixobactin Leads to Cell', 60(11), pp. 6510–6517. doi: 10.1128/AAC.01050-16.Address.

Hutschenreuther, A., Birkemeyer, C., Grötzinger, K., Straubinger, R.K., Rauwald, H.W., 2010. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro. *Pharmazie* 65, 290–295.

‘Introducing Bacteria’ (2017) in *A Brief History of Bacteria*. WORLD SCIENTIFIC, pp. 1–37. doi: doi:10.1142/9789813225169\_0001.

Jim, S., Wudeneh, L., Mariana, S. and Dan, A. (2010). Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Product: Lippia tea. Jim Simon, PhD Center for New Use Agriculture and Natural Plant Products available. <http://www.jesimonaesop.rutgers.edu>.

Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. (2009) ‘Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices AND THE RATIONALE FOR PERFORMING’, 7750, pp. 1749–1755. doi: 10.1086/647952.

Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adigüzel A 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85: 231-235

Kiedrowski, M. R. *et al.* (2016) ‘Development of an in vitro colonization model to investigate *Staphylococcus aureus* interactions with airway epithelia’, 18(January), pp. 720–732. doi: 10.1111/cmi.12543.

L. Wang, F. Liu, Y. Jiang, Z. Chai, P. Li, Y. Cheng, H. Jing, X. Leng, ‘Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films’, *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 12411 – 12419.

Lee, S. A. *et al.* (2015) ‘General and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), pp. 5189–5194. doi: 10.1073/pnas.1422186112.

Lisin G., Safiyev S. e Craker L.E., (1999). Antimicrobial activity of some essential oils. *Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology*, Eds. V. Martino et al., Acta Hort. 501, ISHS.

Loizzo, M.R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R., 2013. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 59, 586–594.

M. Hyldgaard, T. Mygind, R. L. Meyer, 'Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components', *Front. Microbiol.* 2012, 3, 1 – 24.

Madigan *et al.* (2012) *Microbiologia Brock, Instrumentos Familiares*. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

Menut, C., Lamaty, G., Samate, D., Nacro, M. and Bessiere, J.M. (1993). Contribution à l'étude des *Lippia africaines*: Constituants volatils de trois espèces du Burkina Faso. *Rivista Italiana EPPOS*. 11: 23-29

Miller, E. L. (2002) 'THE PENICILLINS : A REVIEW AND UPDATE', 47(6), pp. 426–434.

Mohammad, N. *et al.* (2016) 'Antimicrobial activity of cinnamon oil against bacteria that cause skin infections', *Journal of Scientific Research and Development*, 3(2), pp. 1–6.

Moody JO, Adebisi OA, Adeniyi BA 2004. Do Aloe vera and Ageratum conyzoides enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? *J Ethnopharmacol* 92: 57-60

Morales-soto, A. *et al.* (2015) 'Volatile profile of Spanish Cistus plants as sources of antimicrobials for industrial applications'. Elsevier B.V., 74, pp. 425–433.

Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. (2013) 'Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials', *Frontiers in Microbiology*, 4(JAN), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2013.00422.

Mussato, D. *et al.* (2014) 'MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OBTAINED BY STEAM DRAG', 20, pp. 33–39.

Mussato, D. *et al.* (2017) 'ScienceDirect Antibiotic efficacy — context matters', *CellReports*. Elsevier Ltd, 60(11), pp. 968–980. doi: 10.1128/AAC.01050-16.Address.

N. Stankovic, T. Mihajilov-Krstev, B. Zlatkovic, J. Matejic, V. S. Jovanovic, B. Kocic, L. Comic, 'Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula', *Planta Med.* 2016, 82, 650 – 661.

N. Zouari, I. Ayadi, N. Fakhfakh, A. Rebai, S. Zouari, 'Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic species', *Lipids Health Dis.* 2012, 11, 1 – 12.

Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C. and Rodrigues, C. S. (2007) 'Divulgação Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos', 17(1), pp. 108–113.

Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S. and Dessen, A. (2014) 'Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall', *Protein Science*, 23(3), pp. 243–259. doi: 10.1002/pro.2414.

Ostrosky E. A. *et al.* (2008) 'Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais', *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), pp. 301–307. doi: 10.1590/S0102-695X2008000200026.

Oussou, K.R., Youlou, S., Boti, J.B., Guessennnd, K.N., Kanko, C., Ahibo, C. and Casanova, J. (2008). Etude chimique et activité anti diarrhéique des huiles essentielles de deux plants Aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientist Research*. 24(1): 94-103.

de Pedro, M. A. and Cava, F. (2015) 'Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture', *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00449.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez Mata, D. and Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 201-214.

Pereira, J. G. *et al.* (2012) 'Testes de Redutase para a Avaliação da Qualidade de Leite Cru Refrigerado', *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(2), pp. 77–80.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT 2003. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

Pombo, E.B., (2011) Estudo da actividade antibacteriana dos óleos essenciais *Schinus molle*, dissertação de mestrado (2º ciclo), Mestrado em Bioquímica, Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

Raynor BD. Penicillin and ampicillin. Prim Care Update OB/Gyn1997;4:147–52

Rocha, P. M. D. M. *et al.* (2012) ‘Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.)’, pp. 12023–12036. doi: 10.3390/molecules171012023.

Rudan, I. (1999) *Student Consult Register and activate this title today at studentconsult . com.*

Rolinson, G. N., Geddes, A. M. (2007). The 50th anniversary of the discovery of 6--aminopenicillanic acid (6-APA). International Journal of Antimicrobial Agents, 29, pp. 3-8

S. A. Hayek, R. Gyawali, S. A. Ibrahim, ‘Antimicrobial Natural Products’, in ‘Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education’, Ed. Mendez-Vilas, Formatex Research Center, 2013, Vol. 2, pp. 910 – 921.

Sahm DF, Washington II JA 1991. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hausser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116.

Salton, M. R. J. and Horne, R. W. (1951a) ‘Studies of the bacterial cell wall I. Electron microscopical observation on heated bacteria’, *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 7(C), pp. 19–42. doi: 10.1016/0006-3002(51)90003-0.

Salton, M. R. J. and Horne, R. W. (1951b) ‘Studies of the bacterial cell wall II. Methods of preparation and some properties of cell walls’, *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 7(C), pp. 177–197. doi: 10.1016/0006-3002(51)90017-0.

Shasany A, et al. Use of RAPD and AFLP markers to identify inter-and intraspecific hybrids of *Mentha*. J Hered. 2005;96(5):542–9.

Silhavy, T. J. (2016) ‘Classic spotlight: Gram-negative bacteria have two membranes’, *Journal of Bacteriology*, 198(2), p. 201. doi: 10.1128/JB.00599-15.

Somerville, G. A. and Proctor, R. A. (2009) ‘Biology and Taxonomy Chapter 1 The

Biology of Staphylococci’.

Soro, L. C. *et al.* (2015) ‘Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Lippia multiflora* Mold . Grown in Savannah and Forest Area in the Ivory Coast’, 5026. doi: 10.1080/0972060X.2014.977571.

Springfield EP, Amabeoku G, Weitz F, Mabusela W, Johnson Q 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine* 10: 434-439.

Stryjewski, M. E. and Corey, G. R. (2014) ‘Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : An Evolving Pathogen’, 58(Suppl 1), pp. 10–19. doi: 10.1093/cid/cit613.

Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, II Edição, Ed. Universidade Fernando Pessoa

Taxonomy and systematic of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York City: Churchill Livingstone, 1997:113–37.)

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 19: 61-64.

Tin, S. *et al.* (2009) ‘Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*’, 5(2), pp. 153–160.

Tortora, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L., (2004). *Microbiology: an Introduction*, published by Pearson Education, Inc

Vieira, M. *et al.* (2017) ‘Chemical Composition , Antibacterial , Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* L ABILL . and Seven Mediterranean Aromatic Plants’. doi: 10.1002/cbdv.201700006.

WEIDEL, W., FRANK, H. and MARTIN, H. H. (1960) ‘The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain B.’, *Journal of general microbiology*, 22(1), pp. 158–66. doi: 10.1099/00221287-22-1-158.



WHO, World Health Organization, 'Global action plan on antimicrobial resistance', 2015, p. 1 – 28, available at [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1), accessed May 10, 2019.

Wilson, L. G. (1987) 'The Early recognition of streptococci as causes of disease', *Medical History*, 31(04), pp. 403–414. doi: 10.1017/S0025727300047268.

## **Referências online:**

<https://www.google.com/search?q=cistus+ladanifer>

<https://innspubnet.wordpress.com/tag/lippia-multiflora>

<https://www.indiamart.com/proddetail/eucalyptus-globulus-oil-16467287173.html>

[https://www.banggood.com/30PCS-Mentha-Spicata-Spearmint-Seeds-Perennial-Flower-p-923483.html?cur\\_warehouse=CN](https://www.banggood.com/30PCS-Mentha-Spicata-Spearmint-Seeds-Perennial-Flower-p-923483.html?cur_warehouse=CN)

[https://www.cientic.com/tema\\_monera\\_img5.html](https://www.cientic.com/tema_monera_img5.html)

<https://essaseoutras.com.br/bacterias-gram-positiva-e-negativa-resumo-esquema-organelas-funcoes/>

<https://e-liposuction.com/staphylococcus-aureus/>

<https://www.bbc.com/news/health-13639241>

<https://proeconomy.com/pseudomonas-aeruginosa-in-healthcare>

<http://aneste.org/maytenus-ilicifolia-espinaheira-santa-os-produtos-naturais-que.html/>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gentamicin#section=Structures>

<https://www.ariangas.com/en/product/gas-chromatographic>

<https://centerlabsp.com.br/produtos/microbiologia/mueller-hinton-agar-laborclin>

